Aus der Medizinischen Universitätsklinik Marburg
Direktor: Prof. Dr. G.A. Martini

Coenzym A, Carnitin und ihre Fettsäureester in der Leber und im Blut der Ratte nach akuter und chronischer Äthanolgabe

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Ekkehard Stähler

aus Frankfurt (Main)

Marburg 1969

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Marburg
Direktor: Prof. Dr. G.A. Martini

Coenzym A, Carnitin und ihre Fettsäureester in der Leber und im Blut der Ratte nach akuter und chronischer Äthanolgabe

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Ekkehard Stähler

aus Frankfurt (Main)

Marburg 1969

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der
Universität Marburg am 5. 5. 1969
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr.rer.nat. P. Karlson
Referent: Dozent Dr.med. W. Dölle
Correferent: Prof. Dr.med. G.A. Martini

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	5
II.	Ergebnisse	9
	A) Einfluß von Äthanol auf Coenzym-A, Carnitin und ihre Fettsäureester in der Leber	9
	I) normal ernährte Ratten	9
	a) einmalige Äthanolgabe	9
	b) chronische Äthanolgaben	15
	II) eiweißarm ernährte Ratten	17
	a) Einmalige Äthanolgabe	17
	b) chronische Äthanolgaben	21
	B) Einfluß von Äthanol auf Carnitin, seinen Acetatester und Acetyl-CoA im Blut der Ratte	25
	I) nach einmaliger Alkoholbelastung	25
	II) nach chronischer Alkoholbelastung	26
III.	Diskussion	27
	I) Beeinflussung der Fettsäuresynthese	27
	a) durch Fettsäure-Coenzym-A-Ester	27
	b) durch Carnitinester langkettiger Fettsäuren	32
	II) Beeinflussung der Citratsynthase-Reaktion	33
	a) durch CoA- und Carnitinester langkettiger Fettsäuren	
	III) Effekt auf die Aktivität weiterer Enzyme	37
	a) Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	37
	b) Acetyl-Carnitin-Transferase	38
	c) Palmityl-CoA-Carnitin-Transferase	38
	IV) Der Äthanol-induzierte Anstieg von Coenzym-A und Carnitin	39

V) Coenzym-A und Carnitin im Blut 40
VI) Vergleich der Coenzym-A und Carnitin-Konzentration mit Werten der Literatur 41

IV. Zusammenfassung 45

V. Material und Methoden 47
I) Tiermaterial, Tierfutter, Versuchsansätze, Tab. X mit Körpergewicht, Lebergewicht und Leberproteingehalt 47
II) Aufarbeitung des Lebergewebes, Blutextrakt und Instillation von Äthanol und Glucose, Schema zur Gewebsaufbereitung 50
III) Acetyl-CoA-Bereitung 54
IV) Substratbestimmung 55
V) Benutzte Chemikalien 59

VI. Literaturverzeichnis 60

In der Arbeit benutzte Abkürzungen

ATP: Adenosin triphosphat, ADP: Adenosin diphosphat
Ac.CoA: Acetyl-Coenzym A, Ac.Carnitin: Acetyl-Carnitin
ACT: Acetyl-Carnitin-Transferase
Acyl-CoA-Ester: Coenzym-A-Thioester langkettiger Fettsäuren, Acyl-Carnitinester: Carnitinester langkettiger Fettsäuren, CoA: Coenzym-A, CS: Citratsynthase, FG: Frischgewicht, TG: Trockengewicht, NAD: Nicotinadenin-dinucleotid, NADH: reduziertes NAD, NADP: Nicotinadenin-dinucleotid phosphat

I. Einleitung

Eine vermehrte Fetteinlagerung in die Leber wird sowohl wenige Stunden nach einmaliger Aufnahme größerer Alkoholmengen als auch bei chronischer Äthanolgabe bei Versuchstieren beobachtet (16, 45, 47, 55). Auch beim Menschen wurden ähnliche Veränderungen nach akuter (38) und chronischer (39) Alkoholaufnahme beschrieben. Während das Ausmaß der Fetteinlagerung morphologisch und chemisch bekannt und experimentell gut reproduzierbar ist, bleibt die Pathogenese der alkoholinduzierten Fettleber noch umstritten (29, 36).
Im wesentlichen werden fünf mögliche Faktoren für die durch Alkohol bedingte Leberverfettung diskutiert (Abb.1).

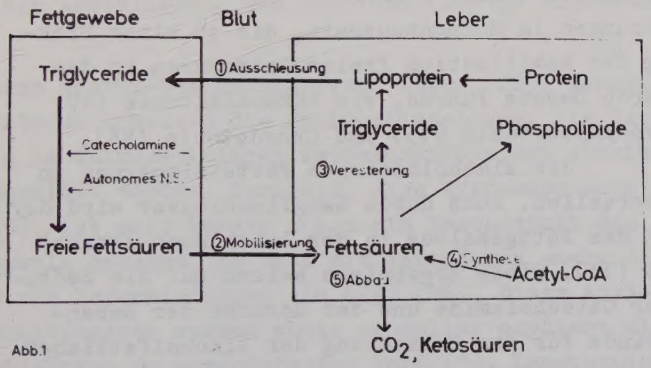


Abb.1: Mögliche Ursachen der Fettleberentstehung.

1) Eine verminderte Fettausschleusung aus der Leber, 2) erhöhte Mobilisation von Fettsäuren aus dem peripheren Fettgewebe, 3) vermehrte Veresterung langkettiger Fettsäuren in der Leber zu Triglyceriden, 4) erhöhte Fettsynthese in der Leber, 5) verminderte Oxydation von Fettsäuren in der Leber.

LIEBER und Mitarbeiter sehen in der Stimulierung der Fettsäuresynthese in der Leber durch Äthanol die Hauptursache für den Anstieg des Leberfettgehaltes (40, 36). LIEBER kommt zu dieser Annahme, da er in der Rattenleber nach Äthanol einen Anstieg des Reduktionsgrades von NAD fand. Über den hierdurch erhöhten Wasserstoffdruck kommt es seiner Ansicht nach zu einer vermehrten Fettsäuresynthese aus den bei der Äthanoloxydation freiwerdenden C_2-Bruchstükken. Entgegen der Hypothese von LIEBER sprechen die Ergebnisse anderer Autoren dafür, daß es durch die gesteigerte Mobilisation von Fettsäuren aus dem peripheren Fettgewebe zu einem Überangebot langkettiger Fettsäuren in der Leber kommt und die dort entstehenden Triglyceride nicht rasch genug wieder an das Blut abgegeben werden können.
Veränderungen im Hormonhaushalt, die zu einer Blokkierung der Mobilisation freier Fettsäuren in den peripheren Depots führen, wie Adrenalektomie (47, I4), Hypophysektomie (55) und Chordotomie (55), hemmen die alkoholbedingte Fetteinlagerung in die Leberzellen. Auch durch Ganglienblocker wird der Anstieg des Fettgehaltes in der Leber nach Äthanol gehemmt (I4). Diese Ergebnisse weisen auf die Bedeutung der Catecholamine und der Hormone der Nebennierenrinde für die Entstehung der Alkoholfettleber hin. Da die genannten Hormone wichtige Stimulatoren der Freisetzung von Fettsäuren im Fettgewebe sind (20), ist es naheliegend, in der vermehrten peripheren Mobilisation von Fettsäuren zumindest einen wesentlichen Faktor der Fettleberentstehung zu sehen.
Über das Verhalten von CoA, dem wichtigsten Coenzym für den intrazellulären Fettsäurestoffwechsel und seiner Fettsäurederivate unter dem Einfluss von Äthanol lagen bisher nur wenige, zum Teil wider-

sprechende Ergebnisse vor (1, 78). Da den langkettigen Fettsäure-CoA-Estern nach Untersuchungen von BORTZ und LYNEN (8, 9) in der Regulation der Fettsäuresynthese und Fettsäureoxydation eine wichtige Rolle zukommt und bereits deutliche Konzentrationsänderungen dieser Ester bei anderen Störungen des Fettstoffwechsels beschrieben wurden (8, 71, 66, 67, 75), war zu erwarten, daß auch unter Äthanoleinfluss Konzentrationsänderungen von CoA- und seinen Acylderivaten auftreten. Solche Änderungen würden zusätzliche Informationen über den Mechanismus der Fetteinlagerung, insbesondere hinsichtlich der von LIEBER aufgestellten Hypothese (36, 40) geben können.

Nachdem von FRAENKEL und FRIEDMANN 1955 eine reversible Acetylierung von Carnitin $(CH_3)_3N^+CH_2\text{-}\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{C}}HCH_2\text{-}COO^-$ durch Acetyl-CoA nachgewiesen wurde (22), konnte in weiteren Arbeiten die Schlüsselstellung, die Carnitin im intrazellulären Fettsäuretransport einnimmt, abgeklärt werden. Carnitin, eine hygroskopische Base (19), ist seit langem schon als Bestandteil des Muskels bekannt. Es geht mit Fettsäuren energiereiche Esterbindungen ein (22) (26). Diese Acyl-Carnitinester werden stets schneller oxydiert als Fettsäuren in unveresterter Form (5). Langkettige freie Fettsäuren (5) und Fettsäure-CoA-Ester (50,58) passieren nicht oder nur sehr langsam die Zellmembranen. Für den Transport durch die Membranen werden die Fettsäuren auf Carnitin übertragen (5,II, 25, 39, 50) (Abb. 2)

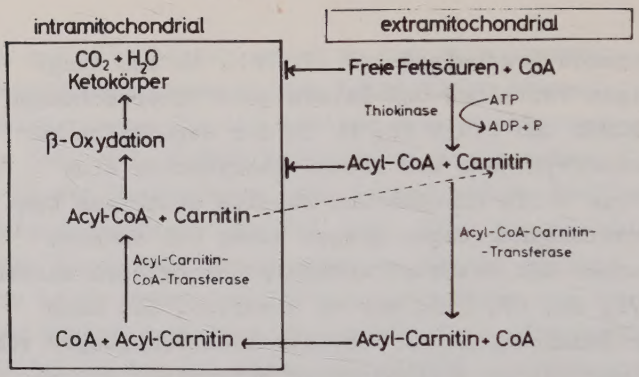


Abb. 2 : Funktion von Carnitin als "carrier" für langkettige Fettsäuren durch Membranen.

Carnitin hat somit eine Trägerfunktion für Fettsäuren durch Membranen.
Die für die Transacylierung erforderlichen Enzyme konnten inzwischen genau charakterisiert und weitgehend gereinigt werden (22, 25, 26, 50, 60).
FRITZ und HSU (24) fanden kürzlich, daß langkettige Fettsäure-carnitinester ähnlich den langkettigen Fettsäure-CoA-Estern regulierend in den Prozeß der Fettsäuresynthese eingreifen, ihre Wirkung ist derjenigen der Acyl-CoA-Verbindungen entgegengesetzt. Bei der vielfältigen Wirkung von Carnitin im Fettsäurestoffwechsel war zu vermuten, daß auch die Messung der Konzentrationen von Carnitin und seinen Fettsäureestern in der Leber einen zusätzlichen Einblick in äthanolinduzierte Änderungen des Fettstoffwechsels geben können.

III. Ergebnisse

A) Einfluß von Äthanol auf Coenzym A, Carnitin und ihre Fettsäureester in der Leber.

I) Bei normal ernährten Ratten

a) einmalige Äthanolgaben

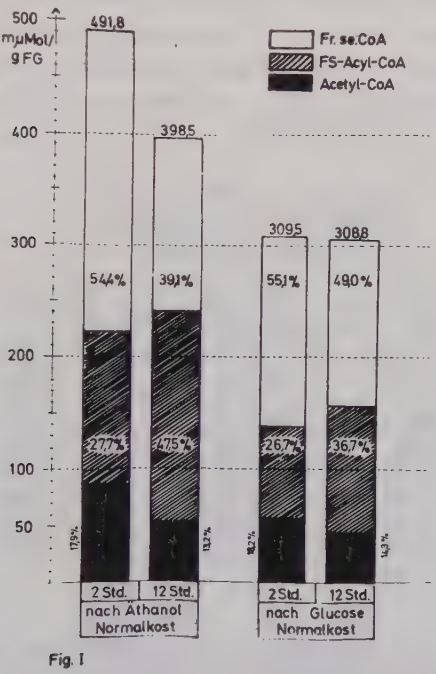


Fig.I: Einfluß einer einmaligen Äthanolgabe auf die Konzentration von Coenzym A und seinen Fettsäureestern in der Rattenleber. Die Kontrolltiere erhielten isokalorische Mengen Glucose. Einzelheiten siehe Text.

Bei der normal ernährten Ratte kommt es zwei Stunden nach einmaliger Äthanolgabe zu einem Anstieg der CoA-Gesamtkonzentration in der Leber. Der Kontrollwert mit einer isokalorischen Menge Glucose liegt

signifikant um 37 % niedriger. Die Zunahme der Konzentration von Ac.CoA, den FS-Acyl-CoA-Estern und freiem CoA geht annähernd parallel. Äthanol bewirkt also in der akuten Phase der Intoxikation eine gleichmäßig starke Zunahme aller drei CoA-Verbindungen.

Zwölf Stunden nach der Äthanolgabe ist der Gesamt-CoA-Spiegel wieder abgefallen, liegt aber noch um 24 % über dem Wert der Kontrolltiere. Bemerkenswert ist eine deutliche Abnahme des freien CoA zu Gunsten eines ausgeprägten Anstieges der langkettigen Fettsäure-CoA-Ester.

ERNÄHRUNG : Normalkost								
	2 Std. nach Zufuhr von							
Substrat	Äthanol •			N	Glucose •			N	t-Test p<
Ac.CoA	88,0	±	20,6	8	56,4	±	16,7	7	0,010
Ac.Carnitin	119,2	±	20,1	8	63,2	±	18,3	7	0,010
FS-Acyl-CoA	136	±	36,0	8	82,6	±	21,0	7	0,010
FS-Acyl-Carn.	118,8	±	29,5	7	59,5	±	15,5	7	0,005
Fr. se.CoA	267,8	±	28,4	8	170,5	±	20,4	7	0,001
Fr. se.Carnit.	334,1	±	47,2	7	173,1	±	43,0	7	0,001

TABELLE I • mµMol/gFG

Tab.I: Konzentrationen von CoA, Carnitin und ihren Fettsäureestern in der Rattenleber zwei Stunden nach der Gabe von 5 g Äthanol/kg Körpergewicht bzw. isokalorischer Glucoseapplikation. Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzberechnung nach Student. Einzelheiten siehe Text.

Auch bei den Kontrolltieren nimmt die Gewebskonzentration der Fettsäure-Acyl-CoA-Ester in der Leber bei gleichzeitigem Abfall des freien CoA und von Acetyl-CoA zu. Das Ausmaß der Veränderung ist allerdings weniger stark als nach Äthanol.

Zu Fig.II

Wie Fig. II zeigt, stieg die Carnitinkonzentration zwei Stunden nach der Äthanolgabe im Vergleich zur Glucosekontrolle etwa um den Faktor 2 an. Das Verhältnis freies Carnitin zu den beiden Esterfraktionen wird dabei durch Äthanol im Vergleich zur Glucosekontrolle nicht wesentlich verändert. Die absoluten Werte aller drei Fraktionen sind nach Äthanol deutlich erhöht. (s. Tab. II).

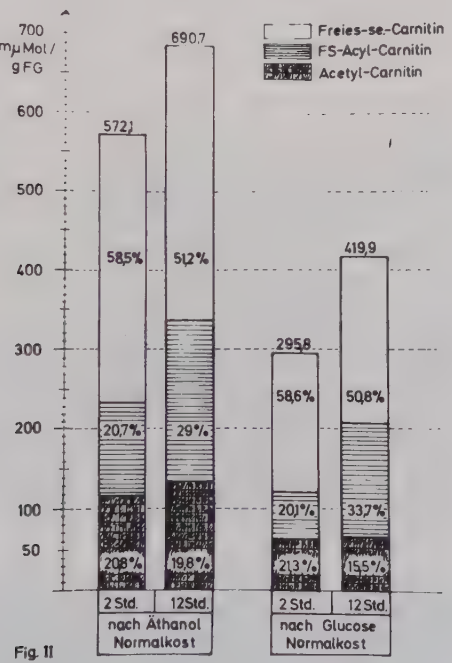


Fig. II: Einfluß einer einmaligen Äthanolgabe auf die Konzentration von Carnitin und seinen Fettsäureestern. Die Kontrolltiere erhielten isokalorische Mengen Glucose. Mittelwerte von 8 - 10 Einzelbestimmungen. Einzelheiten siehe Text.

Bis zwölf Stunden nach der Äthanolgabe steigt der Carnitinspiegel, im Gegensatz zum CoA, noch weiter an.

Auch bei der Glucosekontrolle ist er gegenüber dem Zweistundenwert noch um den Faktor I,41 erhöht, aber um etwa 40 % niedriger als bei Äthanol. Verfolgt man die einzelnen Carnitinfraktionen, so verhalten sie sich ebenfalls anders als beim Coenzym A. Die langkettigen Fettsäure-Carnitinester steigen 12 Stunden nach Äthanol weniger deutlich an, als die langkettigen Fettsäure-CoA-Ester.
Der prozentuale Anstieg ist nach Äthanol etwas geringer als bei der Glucosekontrollgruppe. Die Konzentrationen von freiem Carnitin und Acetyl-Carnitin sind ebenfalls im Gegensatz zu den entsprechenden CoA-Estern, nach 12 Stunden höher als nach zwei Stunden (Fig. II).

ERNÄHRUNG : Normalkost					
	12 Std. nach Zufuhr von				
Substrat	Äthanol •	N	Glucose •	N	t-Test %
Ac.CoA	52,5 ± 8,30	10	44,5 ± 13,4	6	0,20
Ac.Carn.	136,6 ± 19,5	10	65,0 ± 15,8	6	0,005
FS-Acyl-CoA	189 ± 29,6	9	113 ± 30,6	6	0,025
FS-Acyl-Car.	200 ± 42,0	10	141,6 ± 28,0	6	0,01
Freies s-CoA	157 ± 20,2	9	151,3 ± 33,4	6	0,90
Fr. se. Carn.	354,1 ± 34,3	10	213,3 ± 24,9	6	0,005

TABELLE II • mμMol/gFG

Tab. II: Konzentrationen von CoA, Carnitin und ihren Fettsäureestern in der Rattenleber zwölf Stunden nach 5 g Äthanol/kg Körpergewicht bzw. isokalorischer Glucosegabe. Mittelwerte, Standardabweichung und Signifikanzberechnung nach Student.

Bei Berechnung der Quotienten: langkettige Acyl-CoA-Ester/freies CoA und langkettige Acyl-Carnitinester/freies Carnitin wird das unterschiedliche Verhalten klar ersichtlich (Tab. III und Tab. IV). Ersterer

steigt von 5,1 (2 Stundenwert) auf 12 (12 Stundenwert) nach einmaliger Äthanolgabe an. Letzterer von 3,6 (2 Stundenwert) auf 5,7 (12 Stundenwert). Bei der Glucosekontrolle sind die Verhältnisse ähnlich.

	VERSUCHSDAUER				
	2 Stunden		12 Std.	5 Monate	
KOST / VERSUCH	Normalkost	1Mo.eiweißarm	Normalkost	Normalkost	Eiweißarm
Äthanol	5,10	114,0	12,0	9,65	151,0
Glucose	4,85	23,1	7,48		
H_2O				8,13	38,6

Tab. III: Quotienten Fettsäure-Acyl-CoA / freies CoA (x 10) nach akuter und chronischer Äthanolapplikation bzw. isokalorischen Glucosemengen bei unterschiedlichen Ernährungsbedingungen. Kontrollen beim Langzeitversuch mit Wasser.

	VERSUCHSDAUER				
	2 Stunden		12 Std.	5 Monate	
KOST / VERSUCH	Normalkost	1Mo.eiweißarm	Normalkost	Normalkost	Eiweißarm
Äthanol	3,56	5,45	5,71	6,70	10,0
Glucose	3,44	5,25	6,16		
H_2O				4,74	6,65

TABELLE . Quotient : FS-Acyl-Carnitinester / Freies-säureextrahierbares-Carnitin (x 10)

Tab. IV: Quotienten Fettsäure-Acyl-Carnitinester / freies Carnitin nach akuter und chronischer Äthanolgabe bei unterschiedlichen Ernährungsbedingungen. Kontrollen mit isokalorischen Glucosemengen und Wasser.

Das Verhältnis Acetyl-CoA / freies CoA bleibt bei normal ernährten Ratten innerhalb von 12 Stunden nach der Äthanolgabe unverändert. Bei der Glucosekontrolle sinkt der Quotient unbedeutend von 3,3 auf 2,95 ab (Tab. V).

	VERSUCHSDAUER				
	2 STUNDEN		12 Std.	5 Monate	
KOST / VERSUCH	Normalkost	1Mo.eiweißarm	Normalkost	Normalkost	Eiweißarm
Äthanol	3,30	1,54	3,34	2,87	9,40
Glucose	3,30	3,0	2,95		
H_2O				3,85	4,71

Tab. V: Quotienten Acetyl-CoA / freies CoA (x 10) nach akuter und chronischer Äthanolgabe unter verschiedenen Ernährungsbedingungen. Kontrollen mit isokalorischen Glucosemengen und Wasser.

	VERSUCHSDAUER				
	2 STUNDEN		12 Std.	5 Monate	
KOST / VERSUCH	Normalkost	1Mo.eiweißarm	Normalkost	Normalkost	Eiweißarm
Äthanol	3,56	3,93	3,87	5,17	2,13
Glucose	3,61	2,93	3,06		
H_2O				3,07	1,34

TABELLE VI Quotient: Acetyl-Carnitin / Freies-säureextrahierbares-Carnitin (x10

Tab. VI: Quotienten Acetyl-Carnitin / freies Carnitin (x 10) nach akuter und chronischer Äthanolbelastung bzw. isokalorischen Glucosegaben unter verschiedenen Ernährungsbedingungen. Kontrollen mit Wasser statt Äthanol.

Der Quotient Acetyl-Carnitin / freies Carnitin ist 12 Stunden nach Äthanol gegenüber den Kontrollen erhöht.

b) chronische Äthanolgaben:

Bei Ratten, die 5 Monate lang mit dem Trinkwasser ca. 2 g Äthanol/Tag erhielten, liegt die Gesamtkonzentration an CoA in der Leber um ca. 20 % höher als bei den Kontrolltieren (Fig. III). Das Verhältnis der drei Fraktionen bleibt weitgehend gewahrt. Lediglich der Anteil des Acetylesters sinkt in der Äthanolgruppe leicht ab.
Die Gesamtcarnitinkonzentration wird durch die fünfmonatige Alkoholzufuhr nicht beeinflußt. Es kommt jedoch zu einer Abnahme des freien Carnitins um ca. 30 %, wobei die Abnahme in gleichen Teilen zu Gunsten der langkettigen Fettsäureester und von Acetyl-Carnitin erfolgt (Fig. IV, Tab. VII).

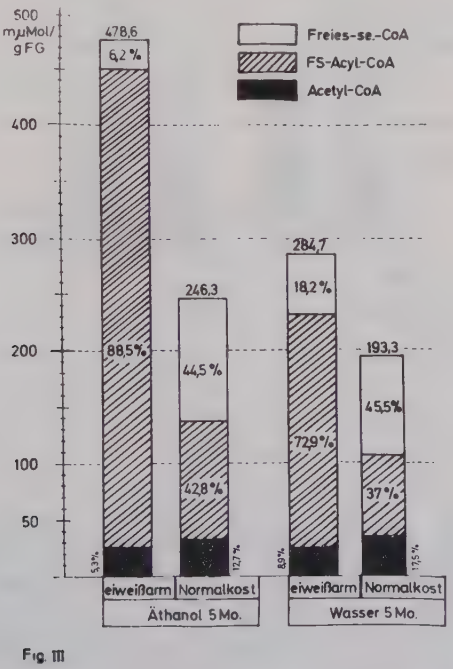


Fig. III

Fig. III: Konzentrationen von CoA und seinen Fettsäureestern unter dem Einfluß chronischer Äthanolbelastung in der Leber. Einzelheiten siehe Text

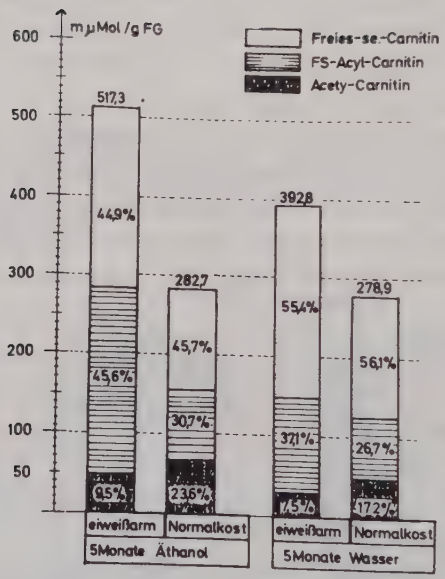


Fig. IV

Fig. IV: Konzentrationen von Carnitin und seinen Fettsäureestern in der Leber nach chronischer Äthanolbelastung (ca. 2g Äthanol/ Tag). Die Kontrolltiere erhielten Trinkwasser. Angabe über prozentualen Anteil am Gesamtpool.

ERNÄRUNG : 5 Monate Normalkost								
Substrat	Äthanol •			N	Wasser •			N	t-Test p«
Ac.CoA	31,3	±	8,36	8	33,8	±	4,49		0,250
Ac.Carnitin	66,8	±	19,1	8	48,0	±	11,4	8	0,050
FS-Acyl-CoA	105,7	±	23,8	8	71,7	±	16,4	8	0,010
FS-Acyl-Carn.	86,7	±	13,1	8	74,2	±	15,3	8	0,200
Fr.se.CoA	109,3	±	24,6	8	87,8	±	18,4	8	0,020
Fr. se.Carnit.	129,2	±	20,6	8	156,7	±	38,6	8	0,200

TABELLE • mμMol/gFG

Tab.VII: Konzentrationen von CoA, Carnitin und ihren Fettsäureestern in der Leber nach chronischer Äthanolbelastung (ca. 2 g Äthanol/Tag). Arithmetische Mittel, Standardabweichung und Signifikanzberechnung nach Student. N: Versuche.

II) Eiweißarm ernährte Ratten

a) einmalige Äthanolgabe

Wie Fig. V zeigt, führt alleine eine Kost mit 1 g Rohprotein/Tag innerhalb von 4 Wochen zu ausgeprägten Veränderungen der Relation der drei untersuchten CoA-Fraktionen. Bei gleichbleibender Gesamtkonzentration steigt der Anteil der langkettigen Fettsäure-CoA-Ester von 27 % im Normalkollektiv auf 64 % an. Der Wert des freien CoA und des Acetyl-CoA sinken entsprechend auf ca. 50 % der Kontrollen ab. Durch Äthanolzufuhr kommt es schon nach 2 Stunden zu einem sehr ausgeprägten Anstieg der langkettigen Fettsäure-CoA-Ester auf nahezu das Dreifache des Wertes, der bei normal ernährten Tieren erreicht wird (Fig. V). Die Gesamt-CoA-Konzentration steigt auch bei den

eiweißarm ernährten Ratten um ca. 30 %, der Anstieg ist jedoch weniger ausgeprägt als bei den Tieren, die Standardfutter erhielten. Der Gehalt an freiem CoA steigt nicht, wie bei den normal ernährten Ratten an, sondern fällt auf ca. 15 % des Vergleichwertes ab. Die Acetyl-CoA-Werte steigen in der eiweißarm ernährten Gruppe weniger deutlich an als bei den Tieren, die Standarddiät erhielten (Fig. V, Tab. VIII).

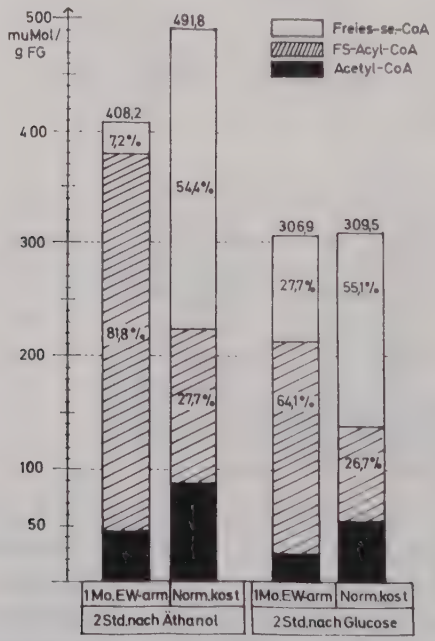


Fig. V

Fig. V: Konzentrationen und prozentuale Anteile am Gesamtpool von CoA und seinen Fettsäureestern in der Leber nach akuter Äthanolbelastung. Kontrollen mit isokalorischer Menge Glucose. Eiweißarme Kost mit ca. 1 g Rohprotein/Tag.

Wie Fig. VI zeigt, steigt die Gesamtkonzentration an Carnitin nach vier Wochen eiweißarmer Kost in der Leber deutlich an. Prozentual nimmt der Anteil der langkettigen Fettsäure-Carnitin-Verbindungen etwas mehr zu, als

freies Carnitin und der Acetatester. Der Anstieg der langkettigen Acyl-Carnitine ist unter der Kost mit 0,6 % Protein jedoch erheblich geringer als der der langkettigen Acyl-CoA-Verbindungen (Fig. V, Tab.VIII). Bei den einen Monat eiweißarm ernährten Tieren steigt die Gesamtkonzentration an Carnitin kaum an, während sie sich, wie oben bereits erörtert, bei der Normalkostgruppe gegenüber der Glucosekontrolle fast verdoppelt. Im Gegensatz zu den ausgeprägten Veränderungen bei den Coenzym-A-Verbindungen (Fig. V) bleibt zwei Stunden nach Äthanolapplikation bei den eiweißarm ernährten Tieren der prozentuale Anteil langkettiger Fettsäure-Carnitinester praktisch unverändert. (Fig. VI, Tab. VIII).

ERNÄHRUNG : 1 Monat eiweißarm					
	2 STd. nach Zufuhr von				
Substrat	Äthanol •	N	Glucose •	N	t-Test p«
Ac.CoA	45,0 ± 6,75	8	25,4 ± 4,30	7	0,001
Ac.Carn.	91,0 ± 21,3	8	66,3 ± 18,1	7	0,025
FS-Acyl-CoA	334 ± 74,5	8	196,8 ± 44,2	8	0,005
Fs-Acyl-Carn.	126 ± 34,5	8	118,6 ± 33,2	6	0,80
Fr.se.CoA	29,2 ± 7,56	7	84,7 ± 19,8	7	0,001
Fr.se.Carn.	231 ± 47,0	8	227,5 ± 38,6	6	0,60

TABELLE VIII • mμMol/gFG

Tab. VIII: Konzentrationen von CoA, Carnitin und ihren Fettsäureestern in der Leber nach akuter Äthanolbelastung, Kontrollen mit isokalorischer Glucosemenge. Arithmetisches Mittel, Standardabweichung, Signifikanzberechnung nach Student. N: Zahl der Versuche.

ERNÄHRUNG : 5 Monate eiweißarm					
Substrat	Äthanol •	N	Wasser •	N	t-Test P<
Ac.CoA	26,4 ± 4,47	5	25,2 ± 4,25	8	0,70
Ac.Carnit.	49,3 ± 7,43	5	29,3 ± 5,92	8	0,001
FS-Acyl-CoA	424,2 ± 34,3	5	206 ± 24,9	8	0,001
FS-Acyl-Carn.	235 ± 47,9	5	145,2 ± 33,2	8	0,005
Freies-seCoA	28,0 ± 4,90	5	53,5 ± 9,06	8	0,025
Fr.se.Carnit.	233 ± 27,9	5	218,3 ± 41,8	8	0,60

TABELLE • mμMol/g FG

Tab. IX: Konzentrationen von CoA, Carnitin und ihren Fettsäureestern in der Rattenleber nach chronischer Äthanolzufuhr. Mittelwerte mit Standardabweichung und Signifikanzberechnung nach Student.

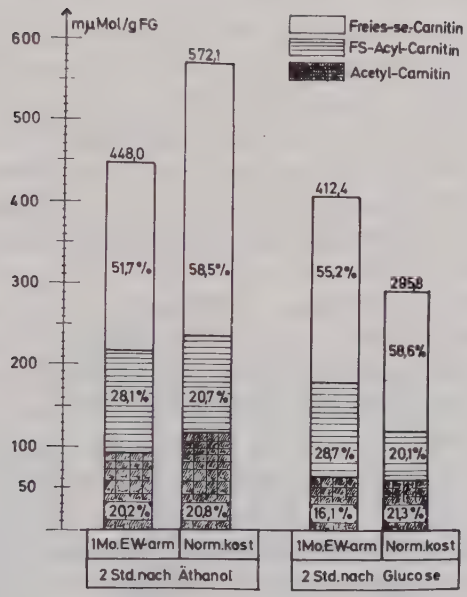


Fig. VI

Fig. VI: Konzentrationen und prozentuale Anteile am Gesamtpool von Carnitin und seinen Fettsäureestern in der Leber nach einmaliger Alkoholgabe (5 g Äthanol/kg Körpergewicht). Kontrollen mit isokalorischen Glucosemengen.

b) chronische Äthanolgabe bei eiweißarmer Kost

Ähnlich den Veränderungen in der Zusammensetzung der drei gemessenen CoA-Fraktionen, die 1 Monat nach fast eiweißfreier Kost (0,6 % Protein) zu beobachten sind (Fig. V), kommt es unter Langzeitfütterung einer eiweißarmen Kost (5 % Protein) zu einer deutlichen Zunahme des Gewebsspiegels langkettiger Fettsäure-

CoA-Ester (Fig. III, Tab. IX). Die Gesamtkonzentration an Coenzym A nimmt um das 1,5-fache zu. Der relative und absolute Anteil an freiem CoA nimmt stark ab. Der prozentuale Anteil an Acetyl-CoA ist etwas weniger ausgeprägt, aber ebenfalls signifikant verringert, während der absolute Wert keine stärkere Abweichung von der Kontrollgruppe aufweist (Fig. III, Tab. IX). Der starke Anstieg der Gesamt-CoA-Konzentration in der Leber um einen Faktor 1,5 ist im wesentlichen durch eine extreme Zunahme der langkettigen Fettsäure-CoA-Ester bedingt (Fig. III, Tab. IX). Fast 90 % des in der Leber verfügbaren CoA liegt in der Form langkettiger Fettsäureester vor. Während der Absolutwert der Acetyl-CoA-Konzentration sich nur wenig ändert, sinkt die Konzentration an freiem CoA im Lebergewebe stark ab. Der Quotient Fettsäure-CoA-Ester / freies CoA steigt entsprechend von 9,7 auf 151 an! (Tab. III). Der Vergleich mit den Werten der Ratten, die bei normaler Kost über fünf Monate Äthanol im Trinkwasser erhielten, zeigt ebenfalls sehr ausgeprägte Unterschiede.

Unter chronischer Äthanolgabe bei gleichzeitig eiweißarmer Ernährung steigt auch die Gesamtkonzentration an Carnitin deutlich an (Fig. IV, Tab. IX). Im Vergleich mit den eiweißarm ernährten Kontrolltieren ist auch hier vorwiegend der Gewebsspiegel der langkettigen Fettsäureester signifikant erhöht. Die Zunahme der Carnitin-Acyl-Ester ist noch stärker bei der Gegenüberstellung mit den Werten der normal ernährten Tiere, sie ist jedoch weit weniger markant als die der langkettigen Fettsäure-CoA-Ester. Der Gewebsspiegel des freien Carnitin nimmt in der eiweißarm ernährten Äthanolgruppe verglichen mit der Kontrolle ohne Äthanol nicht ab. Das ist ein wesentlicher Unterschied zur Konzentration des freien CoA in der Leber der gleichen Tiere. Der prozentuale Anteil des freien

Carnitin ist bei den eiweißarm ernährten Ratten bei chronischer Äthanolgabe nicht niedriger als bei den Tieren, die Normalkost erhielten. Die Vermehrung der langkettigen Fettsäure-Carnitin-Ester geht in der eiweißarm ernährten Gruppe fast vollständig auf Kosten der Acetyl-Carnitin-Konzentration (Fig. IV). Das unterschiedliche Verhalten der Carnitin- und Coenzym-A-Fraktionen bei eiweißarmer Kost wird auch durch die Quotienten langkettige Fettsäure-Ester / freies Coenzym veranschaulicht (Tab. IV u. III).

	5 Monate Äthanol		5 Monate Wasser	
	Normalkost	Eiweißarm	Normalkost	Eiweißarm
Substrat	t-Test : p≪		t-Test : p≪	
Acetyl-CoA	0,250		0,001	
Acetyl-Carnit.	0,100		0,001	
FS-Acyl-CoA	0,001		0,001	
FS-Acyl-Carnit.	0,001		0,001	
Fr. se. CoA	0,001		0,005	
Fr. se. Carnit.	0,001		0,020	

TABELLE XI

Tab. XI: Signifikanzberechnung nach Student für die Konzentrationen von CoA, Carnitin und ihren Fettsäureestern nach chronischer Äthanolapplikation bei Normalkost und eiweißarmer Ernährung. Kontrolle mit normalem Trinkwasser.

Wie aus Tab. XI zu ersehen ist, bewirkt chronischer Eiweißmangel eine signifikante Änderung der Konzentration von CoA, Carnitin und deren Fettsäureestern in der Rattenleber. Bei zusätzlichen chronischen Alkoholgaben verwischen sich die Konzentrationsunterschiede beim Acetatester von CoA und Carnitin.

	2 Std.nach Äthanol		2 Std.nach Glucose	
	1Mo.eiweißarm	Normalkost	1Mo.eiweißarm	Normalkost
Substrat	t-Test : p ≪		t-Test : p ≪	
Acetyl-CoA	0,001		0,001	
Acetyl-Carnit.	0,100		0,800	
FS-Acyl-CoA	0,001		0,005	
FS-Acyl-Carnit.	0,600		0,050	
Freies-se-CoA	0,001		0,001	
Freies-se-Carn.	0,005		0,050	

TABELLE X

Tab. X: Signifikanzberechnung nach Student für die Konzentrationen von CoA, Carnitin und ihren Fettsäureestern in der Leber nach einmaliger Äthanolgabe zwischen normal und eiweißarm ernährten Tieren. Kontrolle mit isokalorischen Glucosemengen.

Der t-Test in Tab. X macht deutlich, daß vor allem die CoA-Fraktionen in ihren Gewebskonzentrationen differieren, wenn vor der Äthanolbelastung eiweißarme Kost verabreicht wurde. Nur das freie Carnitin zeigt einen ebenso eindeutigen Konzentrationsunterschied. Bei der Glucosekontrolle laufen die Verhältnisse fast parallel.

B) Einfluß von Äthanol auf Carnitin, seinen Acetatester und Acetyl-CoA im Blut der Ratte

I) Nach einmaliger Alkoholbelastung

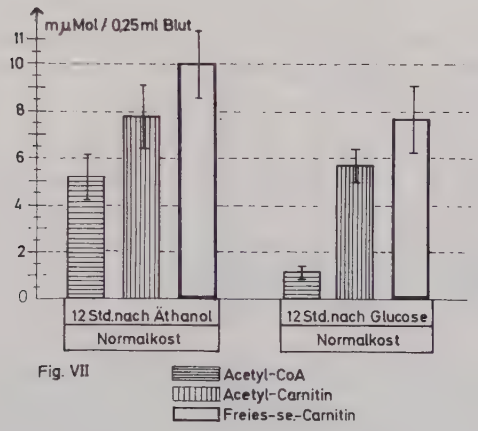


Fig. VII

Fig. VII: Blutspiegel von Carnitin, seinem Acetatester und Acetyl-CoA nach einmaliger Gabe von 5g Äthanol/kg KG. peroral. Arithmetische Mittel mit Standardabweichungen. Kontrollen mit äquikalorischen Mengen Glucose. Zahl der Versuche: N=8

12 Stunden nach der Äthanolbelastung steigt die Konzentration der drei untersuchten Verbindungen im Blut an. Der Blutspiegel von freiem Carnitin lag bei 40 μm Mol/ml. Ein ausgeprägter Konzentrationsunterschied zur Glucosekontrolle konnte nur beim Acetyl-CoA gemessen werden, die Werte waren nach Äthanol um den Faktor 4,2 erhöht. Auch Acetyl-Carnitin fand sich um das 1,5-Fache vermehrt. Die Relation der beiden Acetylverbindungen blieb nach Äthanol im Vergleich zur Glucosekontrolle annähernd gewahrt.

II) Chronische Äthanolbelastung

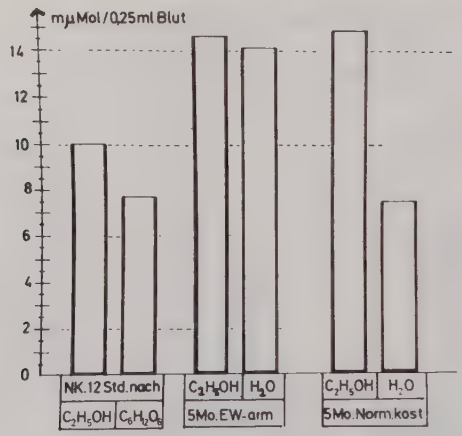


Fig. VIII: Konzentrationen von freiem Carnitin im Blut der Ratte nach chronischen Alkoholgaben und einmaliger Äthanolbelastung. Kontrollen mit isokalorischen Glucosemengen und normalem Trinkwasser. Mittelwerte N= 7-9

Wie aus Fig. VIII zu ersehen ist, schwankt der Carnitinblutspiegel je nach Ernährungssituation und Stoffwechselveränderung durch Äthanol und Glucose erheblich.
Die Konzentrationen liegen nach chronischer Äthanolgabe bei Normalkost und eiweißarmer Kost gleich hoch.
Ein auffallender Unterschied der Carnitinkonzentration im Blut besteht bei den Kontrollen mit normalem Trinkwasser, die Werte bei der eiweißarm ernährten Gruppe liegen höher als bei den normal ernährten Tieren, bei denen ein Blutspiegel von 30 mμ Mol/ml Blut bestimmt wurde.

IV. Diskussion

I) Beeinflussung der Fettsäuresynthese

a) durch Fettsäure-Coenzym-A-Ester.

Der Spiegel von Acyl-CoA-Estern ist in den ersten zwei Stunden nach Äthanolapplikation zwar absolut deutlich gegenüber der Kontrolle erhöht, der prozentuale Anteil an der Gesamt-CoA-Konzentration jedoch kaum verändert (Fig. I). Zu dieser Zeit ist der Triglyceridgehalt der Leber auch nur wenig erhöht (35). Das Maximum der Neutralfetteinlagerung in die Leber nach einmaliger Äthanolgabe wurde 12 bis 15 Stunden später mit einem Anstieg der Triglyceride auf das 7-Fache des Ausgangswertes gemessen (35)(Tab.XIa). Zu diesem Zeitpunkt ist der absolute Gehalt an Acyl-CoA-Estern und gleichzeitig der relative Anteil dieser Fraktion an der Gesamt-CoA-Konzentration deutlich gegenüber den Kontrollen erhöht (Fig. I). Wie der Wert der Glucosekontrollgruppe zeigt, steigt auch hier nach 12 Stunden der Acyl-CoA-Spiegel an. Dieser Anstieg ist jedoch weit weniger ausgeprägt als nach Äthanolzufuhr und ist auf die zwölfstündige Fastenperiode zurückzuführen (8, 67). Die Verschiebung des Quotienten Acyl-CoA-Ester / freies CoA ist nach akuter und chronischer Äthanolzufuhr bei eiweißarm ernährten Ratten viel ausgeprägter (Tab.III). Die eiweißarme Kost an sich führt bereits zu einer Leberzellverfettung (69), so daß unter diesen Bedingungen zwei gleichsinnig wirkende Faktoren die Fetteinlagerung in die Leber begünstigen.

Zur Besprechung der Frage, welche Folgen die starke Zunahme der Konzentration der Acyl-CoA-Verbindungen in der Leber nach Äthanolzufuhr für den Fettsäurestoffwechsel hat, ist die Kenntnis einer Beobachtung von BORTZ und LYNEN (9) wichtig. Diese Autoren

beschrieben 1963 erstmals eine Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase, des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms für die Fettsäuresynthese über Malonyl-CoA, durch Coenzym-A-Ester langkettiger Fettsäuren (Abb.3).

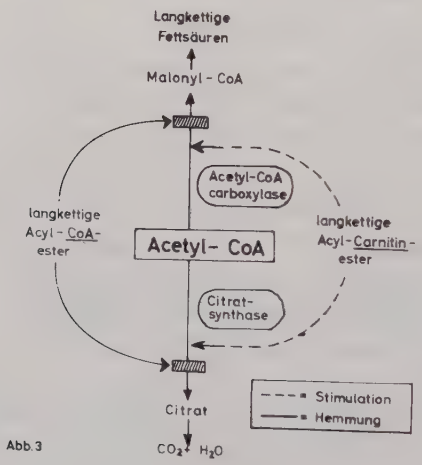


Abb. 3: Einfluß langkettiger CoA- und Carnitin-Ester auf Enzyme des Acetyl-CoA-Stoffwechsels.

$$\text{Acetyl-CoA} + CO_2 + \text{ATP} \xrightarrow[\text{Acetyl-CoA-Carboxylase}]{\text{Biotin}} \text{Malonyl-CoA} + \text{ADP} + \text{P}.$$

Bei der Prüfung des Einflusses steigender Mengen von Palmityl-CoA auf die Aktivität eines aus Rattenleber angereicherten Acetyl-CoA-Carboxylase-Präparates, fanden NUMA et al. 1965 (51), daß eine 50 %ige Enzymhemmung bei Konzentrationen von etwa $2 + 10^{-6}$ Mol / l Palmityl-CoA erreicht wird.
Mit dieser Empfindlichkeit rückt der Effekt in einen Bereich, der zellphysiologisch von Interesse ist.
Bei den Acyl-CoA-Werten, die 12 Stunden nach Äthanol bei normal ernährten Ratten (Fig. I) und bei eiweißarm ernährten Tieren nach akuter und chronischer Äthanolzufuhr (Fig. III u. V) gefunden wurden, ist auf Grund

der Ergebnisse von NUMA et al. eine Hemmung der Fettsäuresynthese in der Leber anzunehmen (51).

Ähnliche Anstiege der Konzentration langkettiger Acyl-CoA-Ester, wie sie hier nach Äthanol beobachtet wurden, konnten auch bei anderen Störungen des Fettstoffwechsels z.B. im Hunger (8, 27) und beim Diabetes mellitus (70) beschrieben werden.
Unter den gleichen Stoffwechselbedingungen wurde eine Hemmung der Fettsäuresynthese in vitro beobachtet (Hunger: 33, Fettverfütterung: 10, 73, Diabetes mellitus: 73). Diese Befunde lassen auch in vivo eine Beeinflussung der Fettsäuresynthese bei der Reaktion der Acetyl-CoA-Carboxylase durch langkettige Acyl-CoA-Verbindungen im Sinne einer "feed-back"-Hemmung annehmen.
Der hier diskutierte starke Anstieg der Acyl-CoA-Verbindungen läßt somit eine indirekte Hemmung der Fettsäuresynthese durch Äthanol vermuten. Die Befunde stützen die Annahme ISSELBACHER'S et al. (29), daß die Äthanol-bedingte Fetteinlagerung nicht durch eine Stimulierung der Fettsäuresynthese, wie von LIEBER(36) diskutiert, sondern vorwiegend durch eine vermehrte Mobilisierung von Fettsäuren im Fettgewebe verursacht ist (Abb. 4).
Wie eingangs besprochen, führt Äthanol zu einer Ausschüttung von lipolytisch wirksamen Hormonen, vorwiegend Catecholaminen (54), die die vermehrte Fettsäurefreisetzung auslösen (20). Nach Äthanol wurde auch entsprechend ein Anstieg der freien Serumfettsäuren gemessen (46). Die vermehrt in die Leber gelangenden Fettsäuren werden bevorzugt zu Triglyceriden verestert, diese können offensichtlich nur mit unzureichender Geschwindigkeit von der Leber an das Blut abgegeben werden (14). Die besprochene "feed-back"-Hemmung der Fettsäuresynthese ist bei der Überflutung der Leber mit langkettigen Fettsäuren nach

Äthanol ein sinnvoller Mechanismus, da hierdurch eine weitere Überladung der Leberzellen mit Fett vermieden wird (Abb. 4).

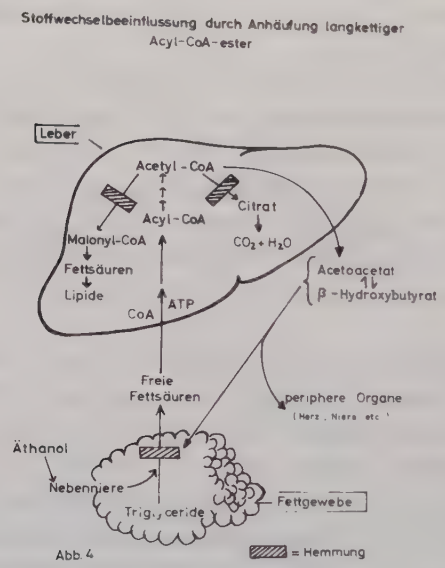


Abb. 4: Einfluß langkettiger Acyl_CoA-Ester auf den Fettsäurestoffwechsel in Leber und Fettgewebe.

Eine Stimulierung der Fettsäuresynthese nach der Vorstellung von LIEBER (36) wäre bei Berücksichtigung der zu erwartenden Hemmung der Fettsäuresynthese durch höhere Acyl-CoA-Konzentrationen am ehesten noch in der frühen Phase der Alkoholintoxikation bei normal ernährten Tieren zu erwarten (Fig. I). Zu diesem Zeitpunkt ist die Acyl-CoA-Konzentration noch relativ niedrig, offensichtlich ist das Fettsäureangebot in dieser Phase noch nicht so groß.

Stärkere Änderungen der Lipidkonzentrationen wurden entsprechend erst nach einer Zeitspanne von mehr als 2 Stunden nach der Äthanolbelastung beobachtet (35).

Tab.XIa In der Rattenleber:
Triglyceridgehalt nach 5 g Äthanol/kg Körpergewicht (KUTOB, PLEA 1962) (35)

Versuch	mg Triglyceride/g Fg.
Kontrolle	7
1 Std. nach Ä.	10
3 " " "	16
6 " " "	19,6
9 " " "	22,4
15 " " "	45
18 " " "	17,5
21 " " "	14,3
48 " " "	3,3

LIEBER (36) nimmt an, daß durch den von ihm und anderen Autoren (55, 57) gemessenen Anstieg des Quotienten NADH/NAD und den hieraus vermuteten, durch Äthanol bedingten höheren intrazellulären Wasserstoffdruck auf Fettsäuresynthese umgeschaltet wird. Hiergegen ist einzuwenden, daß durch Fettsäuren alleine in isolierten Lebermitochondrien (4) und auch in der perfundierten Rattenleber (41) ein starker Anstieg des NADH/NAD-Quotienten beobachtet wurde.
Es ist somit offen, ob der Anstieg des NADH/NAD-Quotienten nach Äthanol nur durch Äthanol selbst hervorgerufen wird, oder nicht auch die Oxydation der vermehrt einströmenden Fettsäuren hierfür mit eine Rolle spielt.

b) Carnitinester langkettiger Fettsäuren

Die langkettigen Fettsäurecarnitinester verhalten sich in der Tendenz ähnlich den Coenzym-A-Estern. Auch ihre Konzentration steigt nach Äthanol in der Leber an (Fig. II). Die Zunahme der Acyl-Carnitin-Ester ist jedoch sehr viel geringer ausgeprägt, als die der CoA-Ester langkettiger Fettsäuren (Tab. II, IX, VIII). Der Quotient Acyl-Carnitin / freies Carnitin ändert sich im Gegensatz zum Quotienten Acyl-CoA / freies CoA unter den verschiedenen Versuchsbedingungen nur relativ wenig (Tab. IV, III).
Die Betonung dieser Ergebnisse ist für die oben erfolgte Diskussion der Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase durch langkettige Acyl-CoA-Verbindungen von Bedeutung. FRITZ et al. (24) konnten nämlich kürzlich zeigen, daß die Palmityl-CoA bedingte Hemmung des Enzyms durch (-) Palmityl-Carnitin zum Teil reversibel ist (Abb. 3). Langkettige Fettsäurecarnitinester wirken offensichtlich als Gegenspieler der langkettigen Acyl-CoA-Verbindungen in der Zelle. Nach den Ergebnissen von FRITZ et al. ist allerdings die doppelte (-) Palmityl-Carnitin-Konzentration erforderlich, um die durch eine bestimmte Menge Palmityl-CoA hervorgerufene 50 %ige Hemmung des Enzyms zur Hälfte rückgängig zu machen (24). Unter dem Vorbehalt, daß es unklar ist, in wieweit die an gereinigten Enzympräparaten erhobenen Befunde auf die Verhältnisse in vivo übertragen werden können, ist für die oben angeführten Situationen mit starker Zunahme des Acyl-CoA-Spiegels in der Leber nach Äthanol mit einer wesentlichen Reduktion der Acyl-CoA bedingten Hemmung der Fettsäuresynthese durch die verhältnismäßig geringe Erhöhung des Acyl-Carnitinspiegels nicht zu rechnen. Bei den gemessenen Werten ist mit der in Abb. 3 und 4 dargestellten Hemmung der Fettsäuresynthese über Malonyl-CoA zu rechnen.

II. Beeinflussung der Citratsynthase-Reaktion durch CoA- und Carnitin-Ester langkettiger Fettsäuren.

Das Enzym der Citronensäuresynthese - Citratsynthase - wird - ähnlich wie die Acetyl-CoA-Carboxylase - in empfindlicher Weise durch langkettige Acyl-CoA-Ester gehemmt (72, 65, 66, 74) (Abb. 3). Von den beiden Reaktionspartnern der Citratsynthase: Acetyl-CoA und Oxalacetat kann nach Untersuchungen des Arbeitskreises von O. WIELAND (74) nur Oxalacetat mit dem Inhibitor in Konkurrenz treten. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird somit nicht durch die Acetyl-CoA-Konzentration beeinflußt werden. Da es sich bei dem Konkurrenten des Oxalacetats um eine chemisch völlig andersartige Verbindung handelt, war es wahrscheinlich, daß es sich bei dem Palmityl-CoA-Effekt um eine "allosterische" Wirkung auf das Enzym Citratsynthase nach der Vorstellung von MONOD et al. (49) handelt. Diese Annahme konnte durch eingehendere Studien von WIELAND und seinem Arbeitskreis bewiesen werden (74,75).

Auch für die Citratsynthase konnte eine dem Effekt der Acyl-CoA-Ester entgegengesetzte Wirkung langkettiger Fettsäure-Carnitin-Ester nachgewiesen werden (23) (Abb.3). Eine stärkere Stimulierung der Citratsynthase wird jedoch (ebenfalls analog den Wechselwirkungen an der Acetyl-CoA-Carboxylase) erst bei etwa der doppelten Palmityl-Carnitin-Konzentration erzielt. Bei dem sehr viel stärkeren Anstieg der Acyl-CoA-Thioester nach Äthanol (Tab.IX, VII, VIII) ist, mit allen Einschränkungen, die durch die Möglichkeit der ungleichmäßigen Verteilung von Zellinhaltsstoffen auf die verschiedenen Räume der Zelle geboten sind, am ehesten mit einer Hemmung der Citratsynthase zu rechnen.

Die zu erwartenden Folgen einer Hemmung der Citratsynthase durch Äthanol werden aus dem Schema der Abbildung 5 deutlich.

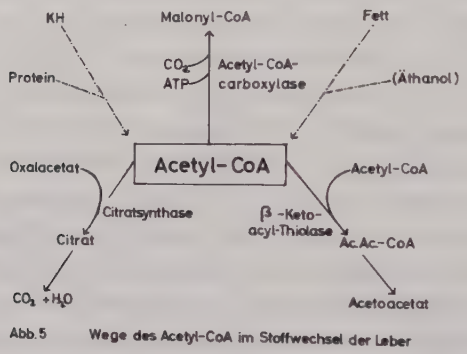


Abb.5 Wege des Acetyl-CoA im Stoffwechsel der Leber

Abb. 5: Wege des Acetyl-CoA im Stoffwechsel der Leber. Bei der Oxydation von Äthanol fallen größere Mengen Acetyl-CoA an.

Äthanol selbst wird primär in der Leber metabolisiert (30), das Fettgewebe ist dazu nach Untersuchungen von LIEBER et al. nicht in der Lage (37), kann dafür aber Acetat als Substrat utilisieren, das also extrahepatisch oxydiert wird (31). Beim Abbau von Äthanol entstehen über die Oxydation bis Acetaldehyd und Acetat zwei Mol an reduziertem, cytoplasmatischem NAD (21) und Acetyl-CoA. Ist die weitere Oxydation zu CO_2 und H_2O über den Citratcyklus und die Verwendung zur Fettsäuresynthese gehemmt, wie auf Grund der angeführten Ergebnisse zu erwarten, ist mit einer vermehrten Ketokörperbildung zu rechnen. Tatsächlich ergaben Parallelbestimmungen von β-Hydroxybutyrat und Acetoacetat bei den gleichen

Versuchstieren nach Äthanol einen raschen und ausgeprägten Anstieg beider Substanzen in der Leber und im Blut (32). Der Anstieg war 12 Stunden nach der Äthanolgabe und bei den eiweißarm ernährten Ratten am stärksten, entsprechend dem deutlichen Anstieg der Konzentrationen langkettiger Acyl-CoA-Thioester (Fig. I, V). Diese Situation der vermehrten ketogenese findet sich auch bei akut diabetischen Stoffwechseländerungen (75, 76) und nach Perfusion der Leber mit Fettsäuren (75, 3, 76). Der Sauerstoffverbrauch der Leber bleibt dabei sowohl nach Äthanol (36) als auch bei den anderen Störungen des Fettstoffwechsels (75) unverändert. Es werden jedoch ca. drei Viertel des gesamten O_2-Verbrauchs für die Ketonkörperbildung benötigt, so daß nur ca. ein Viertel für die Endoxydation des Acetats zur Verfügung stehen kann (3, 61).

Die anfallenden Ketonkörper werden wahrscheinlich in peripheren Organen wie Skelett- und Herzmuskel, wo eine relativ gute Atmungskapacität für diese Substanzen gefunden wurde (5), zuende oxydiert. Möglicherweise übt das vermehrt im Blut vorhandene ß-Hydroxybutyrat einen hemmenden Einfluß auf die Lipolyse im Fettgewebe aus (Abb. 4). Dieser hemmende Effekt wurde zuerst von BJÖRNTORP und SCHERSTEN beschrieben (2). Die unter Äthanolzufuhr erreichten Blutkonzentrationen dieser Substanz liegen im unteren Bereich der für eine Hemmung der Lipolyse erforderlichen Werte (79). Ob dieser Einfluß für die Äthanol-induzierte Lipolyse physiologische Bedeutung hat, ist allerdings völlig offen.

Die Blockierung des Citronensäurezyklus durch hohe Acyl-CoA-Thioesterkonzentrationen sollte theoretisch ein Absinken des Citratspiegels zur Folge haben (Abb.5). Für Citrat wurde von NUMA et al. (51) ein stimulierender Effekt auf die Acetyl-CoA-Carboxylase beobachtet.

Bei verminderter Citratkonzentration ist somit eine zusätzliche Hemmung der Fettsäuresynthese über Malonyl-CoA zu erwarten. Bei der Diskrepanz zwischen den in der Rattenleber mit dem optischen Test gemessenen Citratkonzentrationen (0,2 mM, 75) und der für die Citrataktivierung erforderlichen Halbsättigungskonzentration (6 mM, 51) stößt man jedoch auf Schwierigkeiten, dem Citrat eine wesentliche Rolle in der Regulation der Fettsäuresynthese am Schritt der Acetyl-CoA-Carboxylase in der lebenden Zelle zuzuschreiben.

Von physiologisch größerer Bedeutung für die extramitochondriale Fettsäuresynthese könnte eine reduzierte Citratsynthese bei Berücksichtigung des von KORNACKER et al. (34) beschriebenen Acetattransports aus dem intra- in den extramitochondrialen Raum in Form von Citrat sein.

III. Effekt auf die Aktivität weiterer Enzyme

a) Glucose-6-Phosphatdehydrogenase

Langkettige Acyl-CoA-Thioester, vor allem Palmityl-CoA, zeigen einen starke inhibitorischen Effekt auf die Aktivität der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (9,17,75). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um eine kompetitive Hemmung, die einen verminderten Abbau von Glucose über den Hexose-Monophosphatester nach Äthanolfütterung, was ja zu einem Anstieg der Acyl-CoA-Thioester führt, zur Folge hat. Im Hunger und bei Fettverfütterung konnte tatsächlich eine Verminderung der Glucoseoxydation über diesen Weg nachgewiesen werden (64). Für den Zellstoffwechsel bei Äthanoloxydation ist das von einiger Bedeutung, denn eine verminderte Glucoseoxydation über den Pentosephosphatzyklus hat eine reduzierte NADP-Reduktion zur Folge und das reduzierte NADP wiederum ist essentiell an der Fettsäuresynthese beteiligt. So besteht für die CoA-ester eine weitere Möglichkeit, im Anschluß an ihre starke Zunahme nach Äthanol (Fig. I, III, V) auf den Fettsäurestoffwechsel regulierend einzuwirken. Eine Erniedrigung des Quotienten NADPH/NADP tritt in der Leber unter diesen Bedingungen allerdings nicht in Erscheinung (32).

b) Acetyl-Carnitin-Transferase.

In vitro Studien ergaben, daß die Acetyl-Carnitin-Transferase durch langkettige Acyl-CoA-Ester in ihrer Aktivität eingeschränkt wird, der Acetylgruppentransfer aus den Mitochondrien dürfte dadurch behindert werden (I5).
Diese Hemmung scheint aber in vivo keine wesentliche Rolle zu spielen, denn bei allen Versuchen waren selbst dort, wo ein deutlicher Acyl-CoA-Esteranstieg auftrat, die Acetyl-Carnitinwerte nach Äthanol nicht erniedrigt, sondern sogar höher als die Kontrollen (Fig. II u. IV).

c) Palmityl-CoA-Carnitin-Transferase.

BREMER und NORUM konnten nach eingehenden Untersuchungen 1966 zeigen, daß auch dieses Enzym durch langkettige Acyl-CoA-Thioester eine Aktivitätsminderung erfährt, wobei es sich herausstellte, daß Palmityl-CoA für Carnitin ein kompetitiver Hemmer ist (I2).
Diese Befunde stimmen mit den hier berichteten Untersuchungsergebnissen überein, denn bei den extrem erhöhten Fettsäure-CoA-Estern waren die Carnitinester langkettiger Fettsäuren, wie aus Tab. IX und VIII zu ersehen ist, stets in wesentlich niedrigerer Konzentration vorhanden.

IV. Der Äthanol-induzierte Anstieg von Coenzym-A und Carnitin in der Leber

Akute Äthanolzufuhr führt zu einer deutlichen Zunahme der Konzentration von Carnitin und Coenzym-A in der Leber. Der Anstieg der beiden Substanzen erfolgt dabei zeitlich nicht parallel. Der höchste Wert für CoA wird 2 Stunden, der für Carnitin 12 Stunden nach der Äthanolgabe erreicht (Fig. I und II). Zwei Mechanismen kommen für den Konzentrationsanstieg im wesentlichen in Frage: 1) Ein vermehrter Zustrom aus peripheren Organen über das Blut und 2) eine gesteigerte Neusynthese der beiden Substanzen in der Leber. Für den Anstieg des Carnitinspiegels ist der erstgenannte Mechanismus, wie in Abschnitt V. diskutiert, gut möglich. Coenzym-A hingegen ist ein relativ großes Molekül, das Membranen erheblich schlechter passieren kann als Carnitin (Abb. 2, (5,III)), hier ist eine Neusynthese wahrscheinlicher. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Untersuchung beschrieben AMMON et al. (1) nach akuter Äthanolintoxikation bei der weißen Maus einen Abfall der CoA-Konzentration in der Leber. Der niedrigste Wert wurde von diesen Autoren 1 Stunde nach der Äthanolgabe beobachtet. Der Ausgangswert wurde erst 20 Stunden später wieder erreicht. Die von AMMON et al. benutzte Methodik läßt vermuten, daß nur freies CoA erfaßt wurde, wodurch die Diskrepanz erklärt wäre, denn der Abfall von freiem CoA zugunsten der langkettigen Fettsäureester konnte auch in den eigenen Untersuchungen gezeigt werden.

V. Coenzym-A und Carnitin im Blut

Unter den Versuchsbedingungen, die in der Leber zu einem Anstieg von Gesamt-CoA und Gesamt-Carnitin führen, war auch eine Zunahme der Acetylester beider Verbindungen und des freien Carnitins zu beobachten (Fig. VI u. VIII).

Die Carnitinkonzentration lag unter eiweißarmer Kost im Blut auch bei den Kontrolltieren deutlich über dem Spiegel, der bei Normalkost gemessen wurde, und stieg bei gleichzeitiger chronischer Äthanolgabe nicht weiter an (Fig. VIII).

Die Situationen im Stoffwechsel, die in der Leber die Gesamtkonzentration von Carnitin und seinen Fettsäureestern ansteigen lassen, wie Äthanolbelastung und Eiweißmangel, haben erhöhte Blutspiegel von freiem Carnitin und Acetylcarnitin zur Folge. Es ist denkbar, daß der rasche Anstieg der Carnitinkonzentration in der Leber nach Äthanol durch einen vermehrten Transport aus der Peripherie zustande kommt. Carnitin ist ein kleines Molekül, das schnell Zellmembranen passiert. Zudem ist es in peripheren Organen, wie Herz- und Skelettmuskel, in hoher Konzentration vorhanden (42). Der höhere Carnitinspiegel im Blut kann als Hinweis für einen solchen Mechanismus gedeutet werden. Der beobachtete Anstieg von Acetyl-Carnitin ist eventuell eine Folge des Transportes von Acetatgruppen aus der Äthanoloxydation, die aus der Leber in die Peripherie geschleust werden können (31,37).

Der Anstieg von Acetyl-CoA im Blut kann durch eine vermehrte Acetylierung des CoA in den Erythrocyten bedingt sein. Aus den in Abschnitt IV. besprochenen Gründen ist es weniger wahrscheinlich, daß Acetyl-CoA von den Leberzellen in das Blut abgegeben wird.

VI. Vergleich der Coenzym-A- und Carnitinkonzentrationen mit Werten der Literatur.

Beim Vergleich mit den Werten aus der Literatur liegen die hier bestimmten Normalwerte und Kontrollen im angegebenen Bereich. (Tab.XII). Die Normalwerte für Acetyl-CoA liegen zum Teil über den Angaben anderer Autoren (8, 71, 18) (Tab.XII). Die Acyl-CoA-Thioester stimmen mit den von TUBBS und GARLAND (65, 67) angegebenen Normalwerten gut überein, diese Arbeitsgruppe benutzte die gleiche Methodik zur Konzentrationsbestimmung. Niedrigere Werte erhielten andere Autoren (8, 73, 78), was wohl durch aggressivere Hydrolyseverfahren und fehlenden Zusatz einer reduzierenden Substanz, wie z.B. Mercaptoäthanol, bedingt sein mag.

Die hier gemessenen Konzentrationen an Gesamt-CoA lagen unter den von TUBBS et al. (68) berichteten Werten (Tab.XII). Derartige Konzentrationsschwankungen sind möglicherweise durch unterschiedliche Tierstämme und andere Zuchtbedingungen verursacht, denn in der vorliegenden Arbeit konnte auch gezeigt werden, daß eine Änderung der Nahrungszufuhr rasche Schwankungen in der CoA-Gewebskonzentration mit sich bringt.

	Normal
Acetyl-CoA	22
Acyl-CoA-Ester	48
Freies CoA	114
Gesamt-CoA	196

Normalwerte von CoA und seinen Fettsäureestern. Mittelwerte von N = 7. Angaben in mμ Mol/g Fg. Rattenleber

	Normal	Fasten	Ketose	Diabetes	Fettfütterung	Autor
Acetyl-CoA	16,1 ± 1,7	35,9 ± 2,7				BORTZ, LYNEN 1963 (8)
	19,9 ± 7,4				58,1 ± 17,7	WIELAND, WEISS 1963 (71)
	32,9 ± 3,2	47,0 ± 1,9 (1 Tag)				HERERA, FREINKEL 1967 (28)
	14,1 ± 1,7		17,2 ± 1,1			ERFLE, SAUER 1967 (18)
Acyl-CoA-Ester	14,9 ± 0,5	57,5 ± 7,9				BORTZ, LYNEN 1963 (8)
	30 - 60	19 (18 hr) 180 (48 hr)				TUBBS, GARLAND 1963 (65)
	52	110				TUBBS, GARLAND 1964 (67)
	15			58		WIELAND, EGER-NEUFELDT 1963(73)
	26,8 ± 1,9	69,9 ± 4,23 (36 hr)		22,8 ± 1,6 (n.Äthanol)	87,1 ± 5,2	ZAKIM 1965 (78)
Gesamt-CoA	434 ± 68	513 ± 80 (48 hr)		320 ± 49		TUBBS et al. 1965 (68)

Tab. XII. Konzentrationen von Coenzym-A und seinen Fettsäureestern in der Rattenleber. Zusammengestellt sind Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen. Werte in mμ Mol / g Frischgewicht.

Die in dieser Arbeit zum erstenmal benutzte Methode der Carnitinbestimmung unmittelbar durch den Umsatz mit Acetyl-CoA ergab gut reproduzierbare Werte und in dem Bereich der anfallenden Konzentrationen gute Linearität bei Berücksichtigung des "CoA_Fehlers". Während die Normalwerte für Carnitin bei älteren Untersuchungen niedriger liegen (19, 44) (Tab. XIII), sind die Ergebnisse von PEARSON, TUBBS (53) und BRÖKHUYSEN (13) im gleichen Bereich. Untersuchungen über den Acetyl-Carnitin-Gehalt der Rattenleber lagen bisher nur von PEARSON und TUBBS (54) vor, die gemessenen Konzentrationen lagen in der gleichen Größenordnung wie die eigenen Kontrollwerte.
Quantitative Angaben über den Gehalt der Rattenleber an langkettigen Acyl-Carnitin-Estern lagen bisher nicht vor. Exakte Studien über den prozentualen Anteil langkettiger Acyl-Carnitin-Ester am gesamten Carnitingehalt der Leber wurden von BØHMER und seiner Arbeitsgruppe gemacht, im Hinblick auf diese Relationen liegen die hier berichteten Werte ziemlich hoch. Zu berücksichtigen ist dabei allerdings die völlig andere Untersuchungsmethode, die den Einbau von Methyl-H^3 im endogenen Carnitinpool verfolgt (7). Die in dieser Arbeit angegebenen Quotienten für Acetyl-Carnitin / freies Carnitin (Tab. VI) sind nach Äthanolbelastung etwas niedriger als bei BØHMER et al. (7). Genaue Übereinstimmung dagegen besteht bei dem Quotienten nach chronischer Äthanolbelastung und den Fettverfütterungsversuchen von BØHMER (7). Die von derselben Arbeitsgruppe errechneten Quotienten für Acyl-Carnitin-Ester / freies Carnitin (nach Fasten, Normalkost, Fettfütterung) liegen alle etwas unter den hier berichteten Ergebnissen (Tab. IV).

	Normal	Fasten	Autor
Freies Carnitin (Rattenleber)	100-200 µ g/g TG		FRAENKEL, FRIEDMANN 1957 (19)
Freies Carnitin (Rattenleber)	50 - 115 µ g/g TG.		MEHLMANN, WOLF 1962 (44)
	365		PEARSON, TUBBS 1964 (53)
	10^{-4} - 10^{-3}		BROEKHUYSEN et al. 1965 (I3)
Freies Carnitin (im Serum)	0,051 ± 0,0086 µ Mol/g TG.		MARQUIS, FRITZ 1964 (43)
Acetyl-Carnitin (Rattenleber)	61	115 (40 hr)	PEARSON, TUBBS 1964 (52)

Tab. XIII Konzentrationen von Carnitin und seinem Acetatester in der Rattenleber und Carnitinkonzentration im Serum der Ratte. Ergebnisse verschiedener Autoren. Werte, wenn nicht anders angegeben, in m µ Mol/g FG.

IV. Zusammenfassung

1) Einmalige Gabe von Äthanol (5g/kg Körpergewicht) führt bei normal ernährten Ratten zu einem Anstieg der Coenzym-A-Konzentration in der Leber. Zwei Stunden nach der Äthanolzufuhr ist das Verhältnis freies CoA / Acyl-CoA-ester gegenüber den Kontrollen wenig verändert. Nach 12 Stunden ist es jedoch deutlich zugunsten der Acyl-CoA-ester verschoben. Bei chronischer Äthanolbelastung (2g/Tag über 5 Monate) ist der Anstieg der Acyl-CoA-ester in der Leber noch ausgeprägter.

2) Eiweißarme und fast eiweißfreie Ernährung hat eine deutliche Zunahme der Acyl-CoA-ester in der Leber zur Folge. Der Anteil an freiem CoA nimmt hingegen ab.
Bei den eiweißarm ernährten Tieren erzeugt Äthanolgabe einen sehr viel ausgeprägteren Anstieg der Acyl-CoA-ester als bei den normal ernährten Kontrollen.

3) Die Carnitinkonzentration in der Leber verhält sich nach Äthanolzufuhr ähnlich wie die Coenzym-A-Konzentration. Der Anstieg der Acyl-carnitinester ist in allen untersuchten Phasen deutlich schwächer als der der Acyl-CoA-ester. Der Quotient freies Carnitin / Acyl-carnitinester ändert sich durch Äthanolgabe entsprechend nur relativ wenig.

4) Nach Äthanol ist der "Acetyl-CoA"-Gehalt in der Leber und im Blut erhöht. Ähnlich verhält sich Acetyl-Carnitin.

5) Stoffwechselsituationen, die in der Leber die Gesamtkonzentration an Carnitin ansteigen lassen, bewirken auch einen erhöhten Blutspiegel an freiem Carnitin und Acetyl-Carnitin.

6) Aufgrund der Ergebnisse wird eine indirekte Hemmung der Fettsäuresynthese durch Äthanol über eine durch langkettige Acyl-CoA-ester induziert2 "feed-back"-Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase diskutiert. Der in vitro gefundene Effekt der Acyl-Carnitinester, diese Enzymhemmung teilweise wieder aufzuheben, dürfte im Bereich der hier bestimmten Konzentrationen keine wesentliche Rolle spielen.

7) Für die in der Literatur diskutierte Blockierung des Citratzyklus durch Äthanolzufuhr bieten die Ergebnisse eine Erklärungsmöglichkeit: Hemmung der Citrat-Synthase-Reaktion durch den starken Anstieg von Acyl-CoA-estern.

8) Der Einfluß langkettiger Acyl-CoA-ester auf die Aktivität weiterer Enzyme und die möglichen Stoffwechselfolgen werden erörtert.

9) Eine neue Methode zur Bestimmung von Carnitin über die Spaltung von Acetyl-CoA wird angegeben.

V. Material und Methoden

Experimentelle Angaben

I) Tiermaterial, Tierfutter, Versuchsansätze; Tab. XIV mit Körpergewicht, Lebergewicht und Leberproteingehalt

a) Es wurden männliche Albino-Wistar-Ratten von der Firma BRÜNGER verwendet, die in zehn Gruppen unter verschiedenen Versuchsbedingungen gehalten wurden.

b) Tierfutter: Altromin

Normalkost:	Casein (80 % Rohprotein)	22 %
	Reisstärke DAB 6	62 %
	Sojaöl, raff.	2 %
	Cellulosepulver	4 %
Eiweißarm:	Wie bei Normalkost, jedoch nur 6 % Casein und 80 % Reisstärke.	
Eiweißfrei:	Auch wie bei Normalkost, aber weniger als 1 % Casein und 85 % Reisstärke.	

Alle drei Diäten erhielten gleiche Mengen einer Vitamin- und Spurenelementmischung, die eine ausreichende Versorgung mit diesen Stoffen garantierte.

c) Versuchsansätze: Zehn Gruppen mit folgenden Versuchsanordnungen:

I) E: Normales Altrominfutter und Wasser
V: 2 Stunden Fasten, dann durch Schlundsonde 5 g Äthanol/kg Körpergewicht. 2 Stunden nach Äthanolintoxikation Leberentnahme.
G: 230 - 290 g

II) E: Normales Altrominfutter und Wasser
V: 2 Stunden Fasten, dann durch Schlundsonde 17,5 ml 50 % Glucose / kg Körpergewicht. 2 Stunden danach Leberentnahme.
G: 240 - 300 g

III) E: Altrominfutter und Wasser
V: 2 Stunden Fasten, dann 5 g Äthanol durch Schlundsonde (pro kg Körpergewicht). 12 Stunden nach Äthanol-Intoxikation Leberentnahme.
G: 245 - 300 g

IV) E: Altrominfutter und Wasser
V: 2 Stunden Fasten, dann durch Schlundsonde 17,5 ml 50 % Glucose (pro kg Körpergewicht). 12 Stunden später Leberentnahme.
G: 250 - 290 g

V) E: 5 Monate Altromin-Eiweißarm, zum Trinken 15 % Äthanol. 12 Stunden vor Leberentnahme statt 15 % Äthanol Wasser.
G: 310 - 330 g

VI) E: 5 Monate Altromin-Eiweißarm und Wasser zum Trinken.
G: 330 - 450 g

VII) E: 5 Monate Altromin-Normal und 15 % Äthanol zum Trinken. 12 Stunden vor Leberentnahme nur Wasser zum Trinken.
G: 410 - 500 g

VIII) E: 5 Monate Altromin-Normal und Wasser zum Trinken.
G: 450 - 550 g

IX) E: 1 Monat Altromin-Eiweißfrei und Wasser zum Trinken.
V: 2 Stunden Fasten, dann 5 g Äthanol/kg Körpergewicht. 2 Stunden nach der Intoxikation Leberentnahme.
G: 340 - 390 g

X) E: 1 Monat Altromin-Eiweißfrei und Wasser zum Trinken.
V: 2 Stunden Fasten, dann 17,5 ml 50 % Glucose durch Schlundsonde. Nach 2 Stunden Leberentnahme.
G: 330 - 390 g

	Kontroll-tiere	5 Monate Normalfutter +		5 Monate eiweißarmes Futter	
		Wasser	Äthanol	Wasser	Äthanol
Körpergewicht (g)	215	450	405	390	290
Lebergewicht (g)	8,2	10,3	10,5	8,7	6,0
Proteingehalt d. Leber (mg/g Fg.)●	135	169	164	152	151

Tab. XIV: Körper- und Lebergewicht sowie Proteingehalt der Leber der Ratten, die über 5 Monate Alkohol erhielten. Mittelwerte: N = 7-9. +) 6-8 g Äthanol/kg Körpergewicht/Tag. ●) Bestimmung nach (6)

II) Aufarbeitung des Lebergewebes, Blutextrakt und Instillation von Äthanol und Glucose. Schema zur Gewebsaufbereitung.

a) Leberextraktbereitung:

Nach kurzer Äthernarkose wurden die Ratten auf eine Korkplatte gespannt, die Bauchhöhle eröffnet, ein Leberlappen herausgeschnitten und sofort in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Porcellanmörser getaucht und fein pulverisiert. Das zerriebene Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff aus dem Mörser in ein vorgewogenes Glas geschüttet und nach Verdampfen des Stickstoffs mit der Mikrowaage gewogen, mit eisgekühlter 5 % $HCLO_4$ (1 : 4) versetzt und im Ultraturrax 2^+ 30 Sek. homogenisiert. Dann wurde 10 Min. bei 5000xg zentrifugiert. Vorversuche ergaben, daß durch die kurze Äthernarkose keine feststellbaren Änderungen im Metabolitgehalt hervorgerufen wurden. Die Methode, Lebergewebe mit einer Gefrierzange zu entnehmen (WOLLENBERGER et al. 1960 (77)) wurde nicht verwendet, da hierbei zu wenig Gewebe für die verschiedenen Untersuchungen gewonnen wurde und der Metabolitgehalt für beide Entnahmearten gleich war. Der weitere Arbeitsgang wurde auch schematisch dargestellt. Das Gewebe wurde nach der ersten Zentrifugierung nochmals mit dem gleichen Volumen 5 % $HCLO_4$ rehomogenisiert, wieder bei 5000 x g 10 Min. zentrifugiert, die Überstände dann zusammengegeben und langsam mit 3 N KOH unter der Glaselektrode auf Ph 6,7 eingestellt. Das entstehende $KCLO_4$ wurde abzentrifugiert und verworfen. Vom klaren Überstand wurden Aliquots entnommen zur sofortigen Bestimmung von Acetyl-CoA, Acetyl-Carnitin, freiem Carnitin und CoA.

Das freie Carnitin hielt sich, wenn der Extrakt sofort bei -20 Grad C eingefroren wurde, über mehrere Wochen. Die weitere Aufbereitung des Präcipitates zum Hydrolysieren der Fettsäureester wurde in Anlehnung an TUBBS et al. (68) vorgenommen. Es wurde zweimal mit 5 % $HCLO_4$ gewaschen und dann in definiertem Volumen Wasser gelöst (Präcipitat von ca. 2 g Leber auf ca. 6 ml H_2O) und anschließend neutralisiert. Zum Hydrolysieren wurde das so bereitete Präcipitat alkalisiert und auf eine Endkonzentration von 0,1 N KOH gebracht. Zur weiteren Aufbereitung des Präcipitates zur Bestimmung der Fettsäure-Acyl-Ester wurden von dem in Wasser gelösten und neutralisierten Präcipitat Aliquots entnommen und mit 2 N KOH auf eine Endkonzentration von 0,1 N KOH gebracht. Die Carnitinester wurden 2 Stunden bei 50 C im Thermostaten hydrolysiert, die CoA-Ester 20 Minuten bei 25 C. Zum Stabilisieren von CoA wurde noch Äthylmercaptan bis zu einer Endkonzentration von 20 mM zugegeben. Das nach der Hydrolyse freigewordene Carnitin und Coenzym-A wurde dann, nach Neutralisation des Hydrolysates, wieder mit 5 % $HCLO_4$ extrahiert und unter der Glaselektrode auf ph 6,7 gebracht und zur Bestimmung verwendet. Die Verdünnungsfaktoren wurden zur Konzentrationsberechnung exakt bestimmt.

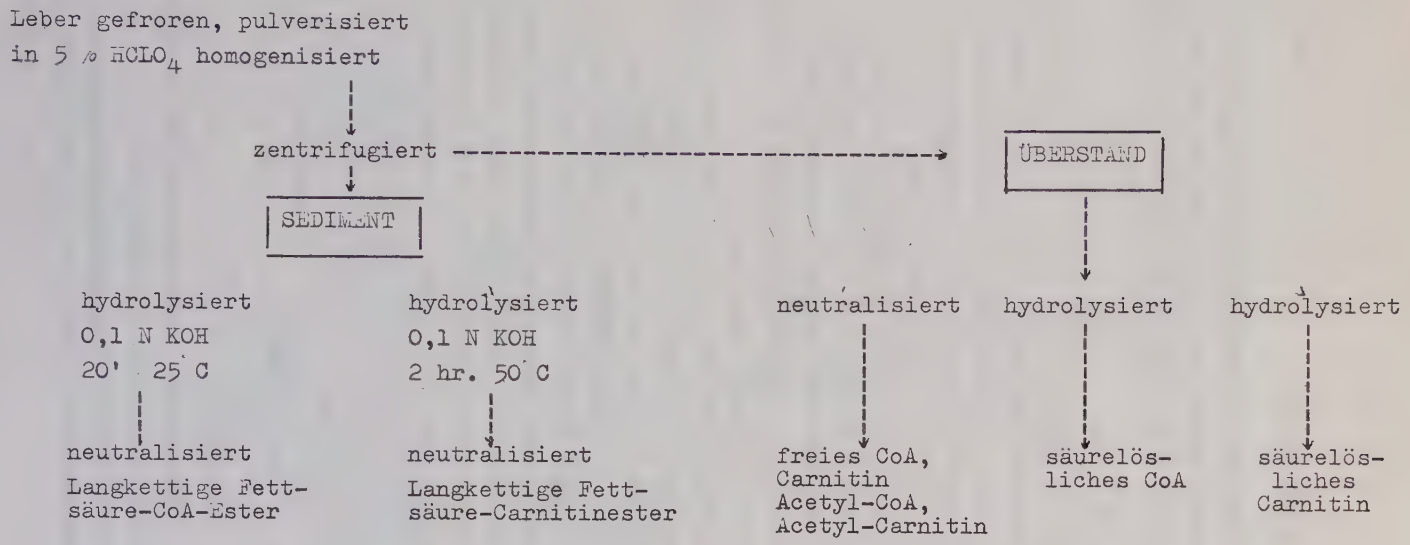
b) Blutextraktbereitung:

Das Blut wurde direkt aus der Herzhöhle durch Punktion mit einer Plastikspritze gewonnen, die zuvor etwas mit Heparin benetzt worden war. Etwa 1 ml Blut wurde dann sofort in eisgekühlte, vorgewogene 5 % $HCLO_4$ gespritzt und homogenisiert. Die weitere Aufbereitung geschah wie bei dem Leberextrakt.

c) Zur Instillation von Äthanol und Glucose wurde eine aus einem Polyaethylenschlauch selbst hergestellte Schlundsonde benutzt. Die Ratten bekamen zuvor einen ganz leichten Ätherrausch.

d) Gewebsaufbereitung zur Bestimmung von Coenzym-A, Carnitin und ihren Derivaten

(modifiziert nach TUBBS et al. (68))



III) Acetyl-CoA-Bereitung

Acetyl-CoA blieb in der hergestellten Lösung bei -20°C über mehrere Wochen stabil, daher war es möglich, in einem Arbeitsgang größere Mengen herzustellen und einzufrieren.
Bei der Herstellung der Acetyl-CoA-Lösung wird wie folgt verfahren:

1) Zur Reduktion von CoA werden 2,5 ml 0,2 M TRIS-Puffer ph 9,o mit 10 ml 2 mM KOH gemischt, darin 100 mg KBH_4 gelöst, dazu in einem Stopfenglas 50 mg CoA (Boeh.), die gesamte Mischung wird 15 Min. bei 37°C gehalten, anschließend in ein Eisbad gestellt und dann mit ca. 500λ 2N H_2SO_4 auf ph 7,2 gebracht und solange gewartet, bis keine Wasserstoffbildung mehr erkennbar ist, denn der ph-Wert ändert sich sonst noch!
2) Der CoA-SH-Lösung wird nun 30λ frischdestilliertes Essigsäureanhydrid zugegeben, gut geschüttelt, mit ca. 200λ 3M KOH auf ph 7,o eingestellt und 40 Min. in ein Eisbad gebracht. Darauf mit ca. 150λ 2N H_2SO_4 auf ph 4,5 titriert. Die Lösung wird nun dreimal mit wassergesättigtem Äther ausgeschüttelt, wobei die obere Phase immer mit einem Polyaethylenschlauch abgesaugt wurde. Zum Schluß Durchblasen von Luft mit einer Pipette zum Entfernen des Äthers. Die Acetyl-CoA-Konzentration wurde mit dem CE-Test bestimmt und betrug im Durchschnitt ca. 3 mM.

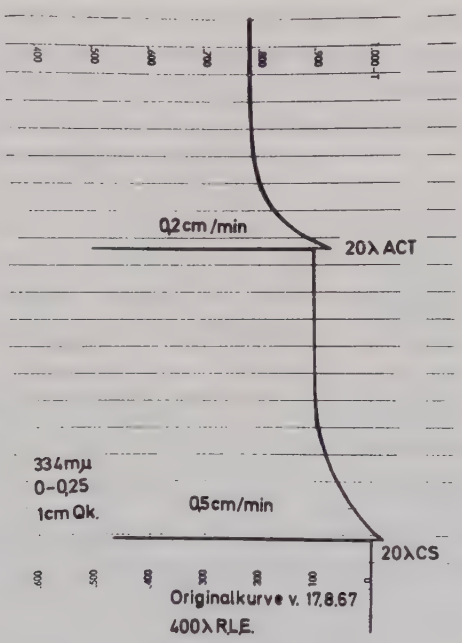
Testansatz: L-Malat I M 25 λ
NAD 0,1 M 25 λ
Ac.CoA-Lösg. 50 λ
TRIS 0,2 M, EDTA 5 mM (ph 8,o) ad 0,5 ml
MDH: 5λ

Start mit 20 λ einer Condensing-enzyme-suspension (Boeh.). 334 mμ, Vol: 0,5 ml, Temp.: 25°C, D:1 cm

IV) Substratbestimmung

a) Acetyl-CoA- und Acetyl-Carnitinbestimmung

Acetyl-CoA und Acetyl-Carnitin wurden in einem kombinierten Test zusammen bestimmt.



Prinzip: Acetyl-CoA kondensiert mit Oxalacetat unter der katalytischen Wirkung von Citrat-Synthase (CS) zu Citronensäure. Das dabei reduzierte NAD wurde am Photometer-Eppendorf bei 334 mμ gemessen.

1) Ac.CoA + L-Malat + NAD $\overset{CS}{\rightleftharpoons}$ Citrat + $NADH_2$ + CoA

2) Ac.Carnitin + CoA $\overset{ACT}{\rightleftharpoons}$ Ac.CoA + Carnitin

Prinzip: Ac.Carnitin wird mit CoA, katalysiert durch die Acetyl-Carnitin-Transferase, zu Ac.CoA und Carnitin umgesetzt. Die Reaktionen 1) und 2) wurden kombiniert und in einem Testansatz erfaßt.(In Anlehnung an PEARSON u. TUBBS (53)).

Die Reaktion wird mit Malat-Dehydrogenase gestartet und dann abgewartet, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat. (Auf der reproduzierten Originalkurve wurde dieser "Vorlauf" fortgelassen). Danach Zugabe von 20 λ Citrat-Synthase (CS) von der Firma Boehringer. Mit der ablaufenden Reaktion wird der Acetyl-CoA-Gehalt des Extraktes erfaßt. Zugabe von 20 λ ACT bewirkt einen weiteren Anstieg der Extinktion, der dem Acetyl-Carnitin-Gehalt im Extrakt entspricht. Gemessen wurde bei 334 mμ mit 1 cm Quarzkuvetten, Temp.: 25°C.

Testansatz:	2 ml
TRIS	50 mM
EDTA	1 mM
GSH *	1 mM
Na-L-Malat	15 mM
NAD	0,25 mM
CoA	0,15 mM
Extrakt:	bis 400 λ
Aqua dest. ad.	2 ml

* GSH, zum Stabilisieren von CoA, wurde täglich frisch angesetzt, da es schnell zerfällt.

b) Carnitinbestimmung

Prinzip: Es wurde die Spaltung der Thioesterbindung von Acetyl-Coenzym-A, katalysiert durch die Acetyl-Carnitin-Transferase, bei 233 mμ am Spektralphotometer PM Q II (Zeiss) verfolgt. Unter den angeführten Bedingungen wurden für steigende Mengen l(-)Carnitin lineare Extinktionswerte erhalten. Die Thioesterbindung zeigt im kurzwelligen Bereich von 230-235 mμ ein Absorptionsmaximum (26,59,62,63).
Bei der Mol- zu Molumsetzung von Acetyl-Coenzym-A und Carnitin mit ACT wird eine äquivalente Menge Coenzym-A frei, das seinerseits eine gewisse Extinktionsänderung zur Folge hat und bei der Berechnung der wahren Extinktionsänderung berücksichtigt und abgezogen werden muß.

1 μMol x 10^{-2} CoA⊕ bewirkt ΔE von 0,011
1 μMol x 10^{-2} Ac.CoA⊕ bewirkt ΔE von 0,112

⊕ Exakte Konzentration enzymatisch ermittelt.

Testansatz: 2 ml

TRIS-HCl ph 7,4 100 mM
EDTA 1 mM
$MgCl_2$ 10 mM
Ac.CoA: 100 λ der selbst hergestellten Lösung (ca. 3 mM)
Aqua dest. ad 2 ml
Start nach Vorlauf mit 20 λ ACT-Suspension (Boe.),
gemessen bei 233 mμ mit 1 cm Quarzküvetten,
Temp.: 25°C.

c) Acyl-CoA- und Acyl-Carnitinester

Die Ester wurden hydrolytisch gespalten, ihre Bestimmung erfolgte dann als freies Carnitin und freies CoA. (Siehe unter b) und d).)

d) Bestimmung von Coenzym-A (nach48)

Prinzip: CoA-S-S-CoA wird mit Thioglykolsäure reduziert, es entsteht CoA-SH, das darauf mit Diketen zu Acetoacetyl-CoA umgesetzt wird. Die Umwandlung des entstandenen Acetoacetyl-CoA zu ß-Hydroxy_Butyrat, katalysiert durch HOADH, wird über den Abfall von reduziertem NAD gemessen, das bei der Reaktion als Coenzym fungiert (48).
Vorbereitung: Modifiziert nach (48). 5 ml des frisch bereiteten Leberextraktes werden mit 5λ Thioglykolsäure versetzt und mit 2N KOH unter der Glaselektrode auf ph 9,0 gebracht. Dann 15 Min. Eisbad und anschließend Zugabe von 5λ Diketen, das mit einem Glasstab oder mit dem Magnetrührer kräftig vermischt wird, der ph-Wert wird mit 5 % $HCLO_4$ auf 7,4 gehalten.
CoA hielt sich stabil in saurem Milieu zwischen ph 4-6, im alkalischen Bereich zerfällt es schnell.
Der mit Thioglykolsäure und Diketen vorbereitete Extrakt wird im Test verwendet, es wird also das gesamte, freie CoA erfaßt. (CoA-S-S-CoA und CoA-SH).
Gemessen wurde am Photometer-Eppendorf bei 334 mμ mit 2 cm Quarz-Spaltkuvetten die Extinktionsabnahme von $NADH_2$.

a) Acetoacetyl-CoA + $NADH_2$ $\xleftarrow{HOADH}$ ß-Hydroxybutyryl-CoA+NAD

Testansatz: 530λ
Na-Pyrophosphat 0,1 M ph: 7,3 500λ
NADH (In 1 % $NaHCO_3$) 0,1 M 5λ
Extrakt (nach Vorbehandlg.) 20λ
Start mit 5λ HOADH (Boe.) 1 : 5 Suspension.

Zum exakten Pipettieren der geringen Volumina wurden Glaspipetten lang ausgezogen und mit der Mikrowaage geeicht.

V) Benutzte Chemikalien

Coenzym-A, Acetyl-Carnitin und sämtliche verwendeten Enzyme stammten von der Firma Boehringer, Mannheim. Acetyl-Coenzym-A wurde selbst hergestellt, siehe Abschnitt V. III.

Carnitin und alle weiteren Chemikalien waren Präparate der Firma Merck, Darmstadt. (Alle Präparate "reinst" oder "pro analysi".)

VI. Literaturverzeichnis

1) AMMON, H.P.T., ESTLER, C.-J., HEIM, F., (1966)
Arch. int. Pharmacodyn 159, Nr. 2, 258:
Akute Äthanolvergiftung und Leberstoffwechsel.

2) BJÖRNTORP, P., SCHERSTÉN, T.:
Effect of ß-hydroxybutyrate on lipid mobilization.

3) BLIXENKRONE-MØLLER, N.:
Respiratorischer Stoffwechsel und Ketonbildung der Leber. Hoppe.Seylers Z.physiol. Chem. 252,117-136 (1938)

4) BODE, Ch., KLINGENBERG, M., (1964):
Carnitine and fatty acid oxidation in the mitochondria of various organs. Biochem.Biophys.Acta 84, 93

5) BODE, Ch., KLINGENBERG, M., (1965)
Biochem. Zeitschrift 341, 271-299:
Die Veratmung von Fettsäuren in isolierten Mitochondrien.

6) BODE, Ch., GOEBELL, H., STÄHLER, E.:
Zur Eliminierung von Trübungsfehlern bei der Eiweißbestimmung mit der Biuretmethode.
Z.klin.Chem. u. klin. Biochem./6. Jahrg. 1968/Heft 5

7) BØHMER, T., NORUM, K.R., BREMER, J.:
The relative amounts of long-chain acylcarnitine, acetylcarnitine and free carnitine in organs of rats in different nutritional states and with alloxan diabetes. Biochim.biophys. Acta 125,244-251 (1966).

8) BORTZ, W.M., LYNEN, F.:
Elevation of long-chain acylcoA derivatives in livers of fasted rats. Biochem.Zeit. 339,77-82 (1963)

9) BORTZ, W.M., LYNEN, F. (1963)
Biochem. Zeitschrift 337, 505
The inhibition of acetyl-CoA-carboxylase by long chain acyl-CoA derivatives.

10) BORTZ, W.M., ABRAHAM, S., CHAIKOFF, I.L. (1963)
J. biol. Chem. 238, 1266:
Localisation of the block in lipogenesis resulting from feeding fat.

11) BREMER, J. (1962)
J. biol. Chem. 237, 2228:
Carnitine in intermediary metabolism.Reversible acetylation of carnitine by mitochondria.

12) BREMER, J., NORUM, K.R., (1966)
J.biol.Chem. 242, Nr. 8, 1744-48:
The mechanism of substrate inhibition of palmityl coenzyme-A: carnitine palmityltransferase by palmityl coenzyme-A.

13) BROEKHUYSEN, J., (1965)
M.J.T. Press. Mass. Cambridge USA, p 23

14) BRODIE, B.B., BUTLER, W.M.Jr., HORNING, M.G., MAICKEL, R.P., MALING, H.M.:
Alcohol induced triglyceride deposition in liver trough derangement of fat transport. Am.J.Clin. Nutrition 9, 432-435 (1961)

15) CHASE, J.F.A. (1965)
Biochem. Journal 95, Nr. 3, 50 p
Some cinetic studies on carnitine acetyltransferase.

16) DI LUZIO, N.R. (1958), Am. Journ. Physiol. 194, 453
Effect of acute ethanol intoxication on liver and plasma lipid fractions of rat.

17) EGER-NEUFELDT, I., TEINZE, A., WEISS, L., WIELAND, O. (1965)
Biochem. Biophys. Res. Com. 19, 43
Inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase by long chain acyl-coenzyme-A.

18) ERFLE, J.D., SAUER, F.:
Acetylcoenzyme-A and acetylcarnitine concentration and turnover rates in muscle and liver of the ketotic rat and guinea pig. J. biol. Chem. 242, Nr.9,1988 (1967)

19) FRAENKEL, G., FRIEDMANN, S. (1957)
"Vitam. and Horm." 15, 74
"Carnitine" In R.S.Harris, G.F.Marian and K.V.Thiman (Editors)

20) FREDERICKSON, D., GORDON, R.S.Jr.:
Transport of fatty acids.
Physiological Rev. 38, 585-630 (1958)

21) FREINKEL, N., ARKY, R.A., et al. (1965):
Alcohol Hypoglycemia, IV: Current concepts of its pathogenesis. Diabetes. Vol. 14, Nr. 6, 350

22) FRIEDMANN, S., FRAENKEL, G. (1955)
Reversible enzymatic acetylation of carnitine.
Arch. Biochem. Biophys. 59, 491

23) FRITZ, I.B.:
Relief of palmityl CoA inhibition of citratesynthase by long-chain acylcarnitine derivatives.
Biochem. Biophys. Res. Com. 22, 744-749 (1966).

24) FRITZ, I.B., HSU, M.P.:
The effect of palmityl-carnitine on hepatic fatty acid synthesis and on acetyl-coA-carboxylase activity.
Biochem. Biophys. Res. Com. 22, 744 (1966).

25) FRITZ, I.B., YUE, K-T.N., (1963)
J. Lipid. Res. 4, 279
Long chain carnitine acyltransferase and the role of acyl-carnitine derivatives in the catalytic increase of fatty acid oxidation induced by carnitine.

26) FRITZ, I.B., SCHULTZ, S.K., SRERE, P.A. (1963)
J. biol. Chem. 238, 2509
Properties of partially purified carnitine acetyltransferase.

27) GARLAND, P.B., RANDLE, P.J., NEWSHOLME, E.A. (1963)
Nature: 200, 169

28) HERERA, E., FREINKEL, N. (1967)
J. Lipid. Res. 8, 515
Internal standards in the estimation of acetyl-CoA in liver extracts.

29) ISSELBACHER, K.J., GREENBERGER, J.N.:
Metabolic effects of alcohol on the liver (completed).
NEW. Engl. J. Med. 270, 351-356 (1964)

30) JACOBSON, E., (1952)
Pharmacol. Rev. 4, 107

31) KATZ, J., CHAIKOFF, I.L. (1955)
Biochim. Biophys. Acta 18, 87
Synthesis via Krebs cycle in the utilization of acetate by rat liver slices.

32) KONO, H., BODE, Ch., GOEBELL, H., MARTINI, G.A.:
Über den Einfluß akuter und chronischer Alkoholgaben auf die Konzentration von Coenzymen und Metaboliten des energieliefernden Stoffwechsels in der Rattenleber (in Vorbereitung).

33) KORCHAK, H.M., MASORO, E.J.:
Changes in the level of fatty acid synthesizing enzymes during starvation.
Biochim. Biophys. Acta 58, 354-356 (1962)

34) KORNACKER, M.S., LOEWENSTEIN, J.M.:
Citrate and the conversion of carbohydrate into fat. The activities of citrate cleavage enzyme and acetate thiokinase in livers on starved and refed rats.
Biochem. J. 94, 209 (1965)

35) KUTOB, S.D., PLEA, G.L.:
The effect of acute ethanol intoxication on chloroform-induced liver demage.
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 135, 245-251 (1962)

36) LIEBER, Ch.S.:
Hepatic and metabolic effects of alcohol.
Gastroenterol. 50, 119 (1966)

37) LIEBER, Ch.S., DE CARLI, L.M., SCHMID, R. (1959)
Biochem. Biophys. Res. Com 1, 302:
Effect of ethanol on fatty acid metabolism
in liver slices.

38) LIEBER, Ch.S., RUBIN, E.:
Alcoholic fatty liver in man on a high protein
and low fat diet. Am.J.Med. 44, 200-206 (1968)

39) LIEBER, Ch.S., JONES, D.P., MENDELSON, J.H.:
Fatty liver, hyperlipemia and hyperuricemia produced
by prolonged alcohol cosumption despite adequte
dietary intake. Tr.A.Am.Physicians 76, 289-301 (1963)

40) LIEBER, Ch.S., SCHMID, R. (1961)
The effect of ethanol onfatty acid metabolism:
Stimulation of fatty acid synthesis in vitro.
J.Clin.Inv. 40, 394

41) LÖFFLER, G., MATSCHINSKY, F., WIELAND, O. (1965)
Über den Mechanismus der gesteigerten Ketonkörper-
bildung II. Redox-Status der isolierten Rattenleber
bei Durchströmung mit Fettsäuren.
Biochem. Zeitschrift 342, 76

42) MARQUIS, N.R., FRITZ, I.B.:
Distribution of carnitine, acetylcarnitine and
carnitine-acetyltransferase in rat tissues.
J. Biol. Chem. 240, 2193-2196 (1965)

43) MARQUIS, N.R., FRITZ, I.B.:
Enzymological determination of free carnitine
concentrations in rat tissues.
J. Lipid. Res. Vol. 5, 184

44) MEHLMANN, M.A., WOLF, G. (1962)
Studies on the distribution of free carnitine
and the occurence and nature of bound carnitine.
Arch. biochem. Biophys. 98, 146

45) MALLOV, S.:
Effect of chronic ethanol intoxication on liver
lipid content of rats.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 88, 246-249 (1955)

46) MALLOV, S.:
Effect of ethanol intoxication on plasma free
fatty acids in rat.
Quart.J.Stud.Alcohol. 22, 250-253 (1961)

47) MALLOV, S.:
Effect of adrenalectomy on ethanol and fat
metabolism in rat.
Am. J. Physiol. 189, 428-432 (1957)

48) MICHAEL, G., BERGMEYER, H.U., in:
H.U.BERGMEYER, Methoden der enzymatischen Analyse.s.513
Herausgegeben von H.U. Bergmeyer, Verlag Chemie 1962
Weinheim/Bergstraße.

49) MONOD, J., CHANGEUX, J.P., JAKOB, F.:
Allosteric proteins and cellular control systems.
J. molec. Biol. 6, 306-329 (1963)

50) NORUM, K.R., BREMER, J. (1963)
Acta. Chem. Scand. 17, 896

51) NUMA, S., BORTZ, W.M., LYNEN, F.:
Regulation of fatty acid synthesis at the acetyl-CoA-carboxylation step. Advances Enzyme Regul. 3, 407-423 (1965)

52) PEARSON, D.J., TUBBS, P.K.: (1964)
Acetyl-Carnitine in heart and liver.
Nature Vol. 202, Nr. 4927, p 91

53) PEARSON, D.J., TUBBS, P.K. (1964)
A sensitive enzymic assay for carnitine.
Biochem. J. 91, 2c

54) PERMAN, E.S.:
Effect of ethanol and hydration on urinary excretion of adrenaline and noradrenaline and on blood sugar of rats.
Acta physiol. Scand. 51, 68-74 (1961)

55) REBOUCAS, G., ISSELBACHER, K.J. (1961)
Studies on the pathogenesis of the ethanol-induced fatty liver. Synthesis and oxidation of fatty acids by the liver.
J. Clin. Invest. V 40, 1355

56) SEAKINS, A., ROBINSON, D.S.:
Changes associated with the production of fatty livers by white phosphorus and by ethanol in the rat.
Biochem. J. 92, 308 (1964)

57) SMITH, N.E., NEWMAN, H.W. (1959)
Rate of ethanol metabolism in fed and fasting animals.
J.B.Chem. 234, 1544

58)SPRENGER, A.F., LOEWENSTEIN, J.M. (1962)
J.B. Chem. 237, 3640

59) SRERE, P.A., SEUBERT, W., LYNEN, F. (1959)
Biochim. Biophys. Acta 33, 313

60) SRERE, P.A., KOSICKI, G.W. (1961)
J.B. Chem. 236, 2557

61) STADIE, W.C., ZAPP, J.A. Jr., LUKENS, F.D.:
The effect of insulin upon the ketone metabolism. of normal and diabetic rats.
J.B. Chem. 132, 423-443 (1940).

62) STADTMAN, E.R., COLOWICK, S.P., KAPLAN, O. (1957)
Methods in Enzymologie Vol. 3, p 931

63) SEUBERT, W., LYNEN, F. (1953)
J. Am. Chem. Soc. 75, 2787

64) TEPPERMANN, H.M., TEPPERMANN, J.:
On the response of hepatic glucose-6-phosphate-dehydrogenaseactivity to changes in diet composition and foot intake pattern. Advanc. Enzyme Regul. 1, 121-136 (1963)

65) TUBBS, P.K., GARLAND, P.B. (1963)
Fatty acyl thioester of coenzyme A: Inhibition of fatty acid synthesis in vitro and determination of levels in liver in normal, fasted and fat- or sugar fed rats.
Biochem. Journ. 89, 25p

66) TUBBS, P.K. (1963)
Inhibition of citrate formation by long chain acyl-thioesters of coenzyme A as a possible control mechanism in fatty acid biosynthesis.
Biochim. Biophys. Acta 70, 608

67) TUBBS, P.K., GARLAND, P.B. (1964)
Variations in tissue contents of coenzyme A thioesters and possible metabolic implications.
Biochem. J. 93, 550

68) TUBBS, P.K., PEARSON, D.J., CHASE, J.F.A. (1965):
Assay of carnitine and coenzyme A and their derivatives in tissues. Recent Research on Carnitine its relation to lipid metabolism.Editor: G.Wolf. M.J.T. Press, Cambridge Mass. USA (1965)

69) VIVIANI, R., SECHI, A.M., LENAZ, G.:
Lipid metabolism in fatty liver of lysine- and threonine deficient rats.
J. Lipid. Res. 7, 473 (1966)

70) WIELAND, O.:
Diabetic acidesis: Biochemical aspects "on the nature and treatment of diabetes". Zusammenfassung des V. Congr. of the internat. Diabetes Federation, Toronto 1964, Excepta medica (Amst). (1965).

71) WIELAND, O., WEISS, L.:
Increase in liver acetyl-Coenzyme A during ketosis.
Biochem. Biophys. Res. Com.10, Nr. 4, 333

72) WIELAND, O., WEISS, L.:
Inhibition of citrate-synthase by palmityl-coenzyme A.
Biochem. Biophys. Res. Com. 13, 26 (1963)

73) WIELAND, O., EGER-NEUFELDT, J.:
Zur Hemmung der Lipoidsynthese der Leber bei Diabetes.
Biochem. Zeitschrift 337, 349-59 (1963)

74) WIELAND, O., WEISS, L., EGER-NEUFELDT, J. (1964)
Hemmung der enzymatischen Citronensäuresynthese durch langkettige Acyl-Thioester des Coenzym A.
Biochem. Zeitschrift, 339, 501

75) WIELAND, O., WEISS, L., EGER-NEUFELDT, J., TEINZER, A., WESTERMANN, B.:
Coenzym-A-Thioester höherer Fettsäuren als mögliche Vermittler enzymatischer Regulationen im Tierkörper.
Klin. Wschr. 43, 645-54 (1965).

76) WIELAND, O., MATSCHINSKY, F., LÖFFLER, G., MÜLLER, U.:
Die Abhängigkeit der Ketonkörperbildung der Leber vom DPNH-Spiegel.
Biochim. Biophys. Acta 53, 412-414 (1961).

77) WOLLENBERGER, A., RISTAN, O., SCHOFFA, G. (1960)
Zur extrem schnellen Abkühlung von Gewebe.
Pflügers. Arch. 270, 399

78) ZAKIM, D.:
Effect of ethanol on hepatic acyl-coenzyme-A metabolism.
Arch. Biochem. Biophys. III, 253-256 (1965)

Herrn Professor Dr. G.A. Martini spreche ich meinen Dank aus für die Erlaubnis zur Bearbeitung des Themas.
Herrn Dr.med. Ch. Bode gilt mein besonderer Dank für seine wertvollen Ratschläge und die freundliche Unterstützung.

Vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht: Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie, Heft I, Jan. 1968. Ergebnisse wurden mitgeteilt auf dem Kongreß für Biochemie: München, Jan. 1968 und dem Hepatologen-Kongreß in Prag: Juni 1968.

Lebenslauf

Am 18. April 1940 wurde ich in Frankfurt/Main als Sohn des Professors der Frauenheilkunde Fritz Stähler und seiner Ehefrau Harriet geboren. Ich habe noch vier ältere Geschwister. Infolge des Krieges kamen wir 1944 nach Siegen, wo ich auch die Volksschule und das humanistische Gymnasium besuchte. Nach der Reifeprüfung im Februar 1960 leistete ich meine einjährige Wehrdienstzeit und konnte mich darauf zum SS 1961 an der medizinischen Fakultät Freiburg einschreiben. Dort bestand ich im Februar 1962 das Vorphysikum und im Oktober 1963 die ärztliche Vorprüfung. Die ersten beiden klinischen Semester studierte ich in Innsbruck, danach wechselte ich über an die Philipps-Universität Marburg, wo ich auch im Dezember 1966 das medizinische Staatsexamen ablegte. Seit Anfang 1966 arbeitete ich im Labor der medizinischen Universitätsklinik Marburg unter Herrn Professor Dr. Martini an meiner Dissertation. Nach dem Staatsexamen hatte ich die Möglichkeit, von Januar bis September 1967 dort auch als Medizinalassistent tätig zu sein und konnte so auch den experimentellen Teil der Arbeit ganz abschließen. Am 12.5.67 heiratete ich die Krankengymnastin Andrea Kumlin. Ab Oktober 1967 hatte ich eine Medizinalassistentenstelle an der zweiten Chirurgie in Hamburg-Barmbek, wegen einer infektiösen Hepatitis mußte ich ab Januar 1968 die Ausbildung dort unterbrechen und konnte erst im August 1968 die Arbeit wieder aufnehmen. Da es wegen der langen Erkrankung nicht möglich war, kurzfristig in Hamburg eine weitere MA-Stelle zu bekommen, zogen wir im Oktober 1968 nach Siegen um, wo ich seither auf der geburtshilflich-gynäkologischen Abteilung bei meinem Vater arbeite.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten in Marburg: Buchholz, Berendes, Braun-Falco, Beckmann, Bommer, Dölle, Gedigk, Knauff, Martini, Marx, Siegert, Schwaiger, Schmid, Schleyer, Würterle,
in Freiburg: Brauer, Bätzner, Fleckenstein, Fischer, Goerttler, Genzel, Hassenstein, Holzer, Holldorf, Haas, Keller, Lüttringhaus, Mey, Mohr, Puff, Rose, Schmidt, Staubesandt, Zollinger,
in Innsbruck: Baumgartner, Berger, Braunsteiner, Heinz, Huber, Halhuber, Konzett, Lang, Tapfer, Schinzel.